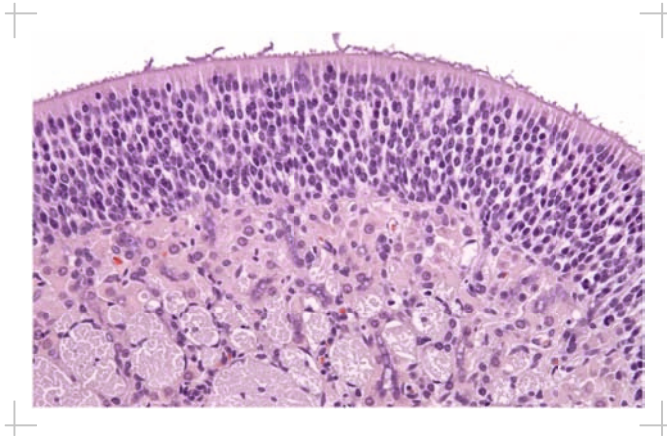


Alexandra Kupke

Die Rolle des olfaktorischen Epithels in der
initialen Phase der Infektion mit dem
neurotrophen *Borna disease virus*



Inaugural-Dissertation zur Erlangung des Grades eines
Dr. med. vet.

beim Fachbereich Veterinärmedizin der Justus-Liebig-Universität Gießen



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

Das Werk ist in allen seinen Teilen urheberrechtlich geschützt.

Die rechtliche Verantwortung für den gesamten Inhalt dieses Buches liegt ausschließlich bei den Autoren dieses Werkes.

Jede Verwertung ist ohne schriftliche Zustimmung der Autoren oder des Verlages unzulässig. Das gilt insbesondere für Vervielfältigungen, Übersetzungen, Mikroverfilmungen und die Einspeicherung in und Verarbeitung durch elektronische Systeme.

1. Auflage 2016

All rights reserved. No part of this publication may be reproduced, stored in a retrieval system, or transmitted, in any form or by any means, electronic, mechanical, photocopying, recording, or otherwise, without the prior written permission of the Authors or the Publisher.

1st Edition 2016

© 2016 by VVB LAUFERSWEILER VERLAG, Giessen
Printed in Germany



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

STAUFENBERGRING 15, D-35396 GIESSEN
Tel: 0641-5599888 Fax: 0641-5599890
email: redaktion@doktorverlag.de

www.doktorverlag.de

Aus dem Institut für Veterinär-Pathologie
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Betreuerin: Prof. Dr. habil. Christiane Herden

**Die Rolle des olfaktorischen Epithels in der initialen Phase
der Infektion mit dem neurotrophen *Borna disease virus***

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines

Dr. med. vet.

beim Fachbereich Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

eingereicht von

Alexandra Kupke

Tierärztin aus Schwelm

Gießen 2016

Mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Dekan: Prof. Dr. Dr. h.c. M. Kramer

Gutachter: Prof. Dr. habil. C. Herden
PD Dr. C. Rummel

Tag der Disputation: 04.04.2016

Ich erkläre: Ich habe die vorgelegte Dissertation selbständig und ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der "Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis" niedergelegt sind, eingehalten.

Teile dieser Arbeit wurden bereits als Poster oder Vortrag vorgestellt:

KUPKE A., AHLEMEYER B., WENISCH S., BAUMGART-VOGT E., HERDEN C. (2011).
Etablierung von *In-vitro*-Methoden zur Charakterisierung der initialen Infektion mit dem neurotrophen Borna Disease Virus.

Poster auf der Sommerveranstaltung des Vereins der Freunde und Förderer der Veterinärmedizin an der Justus-Liebig-Universität Gießen, 2011.

KUPKE A., WEWETZER K., AHLEMEYER B., WENISCH S., HERDEN C. (2012).
Establishment of in vitro methods to study the entry of neurotropic viruses into the central nervous system (CNS) via the olfactory pathway.

Poster auf dem nationalen Symposium für Zoonoseforschung der nationalen Forschungsplattform für Zoonosen, Berlin, 2012.

KUPKE A., EICKMANN M., WEWETZER K., WENISCH S., HERDEN C. (2013).

Untersuchungen zur initialen Phase der Infektion mit dem Borna Disease Virus (BDV).

Vortrag auf der 56. Jahrestagung der Fachgruppe Pathologie der Deutschen Veterinärmedizinischen Gesellschaft, Fulda, 2013. Abstract veröffentlicht in Tierärztliche Praxis Großtiere (3/13).

KUPKE A., EICKMANN M., WEWETZER K., WENISCH S., HERDEN C. (2013).

Borna disease virus (BDV) as a model for neurotropic viruses with olfactory entry.

Vortrag beim Neurokolloquium des Fachbereichs Veterinärmedizin der Justus-Liebig-Universität Gießen, 2013.

1. EINLEITUNG	1
2. LITERATURÜBERSICHT	3
2.1 VIRALE EINTRITTSFORTHEN UND STRATEGIEN ZUR AUSBREITUNG INS ZNS ..	3
2.1.1 Hämatogene Infektion des ZNS	3
2.1.1.1 Infektion von Endothelzellen	3
2.1.1.2 Permeabilitätsstörung der Blut-Hirnschranke	4
2.1.1.3 Leukozytenmigration (<i>leukocyte trafficking</i>).....	4
2.1.1.4 Übertritt von Viren über den Plexus choroideus	5
2.1.2 Neurogene Infektion des ZNS	5
2.1.2.1 Eintritt über sensorische Nerven.....	5
2.1.2.2 Eintritt über motorische Nerven	5
2.1.2.3 Intranasale Infektion des ZNS über olfaktorische Leitungsbahnen.....	6
2.1.3 Viren, die verschiedene Infektionswege nutzen	9
2.1.4 Aufnahme anderer potentiell schädlicher Agentien über das olfaktorische Epithel	10
2.2 AUFBAU DES OLFAKTORISCHEN EPITHEL.....	10
2.2.1 Zellen des olfaktorischen Epithels	11
2.3 DIE BORNASCHE KRANKHEIT	16
2.3.1 Klinik	16
2.3.2 Die natürliche Infektion des Pferdes.....	17
2.3.3 Epidemiologie	18
2.3.3.1 Wirtsspektrum von Bornaviren.....	18
2.3.3.2 Verbreitung der klassischen Bornaschen Krankheit	19
2.3.3.3 Bornavirus-Infektion des Menschen.....	20
2.3.3.4 Reservoir von Bornaviren	21
2.3.4 Tiermodelle zur Untersuchung von Bornavirus-Infektionen.....	22
2.3.4.1 Die intrazerebrale Infektion neonataler Ratten	23
2.3.4.2 Die intrazerebrale Infektion adulter Ratten	24
2.3.4.3 Die intranasale Infektion adulter Ratten.....	27
2.3.4.4 Die intrazerebrale Infektion von Mäusen	28
2.3.5 Bornaviren	29
2.3.5.1 Virusaufbau und Genomorganisation	30
2.3.5.2 Die Proteine des BDV	33
2.3.5.3 Der Infektionszyklus des BDV.....	36
2.3.5.4 Virusausbreitung <i>in vivo</i> und <i>in vitro</i>	40
3. MATERIAL UND METHODEN	42
3.1 CHARAKTERISIERUNG DES OLFAKTORISCHEN EPITHEL DES PFERDES	42
3.1.1 Probengewinnung und Aufbereitung der Proben	42
3.1.2 Histopathologische Untersuchung.....	44
3.1.2.1 Quantitative Auswertung des olfaktorischen Epithels des Pferdes.....	44
3.1.2.2 Untersuchung und quantitative Auswertung der Typen des olfaktorischen Epithels des Pferdes	45
3.1.3 Immunhistologische Untersuchung der Pferdenasen.....	46
3.1.3.1 Seren und Primärantikörper	47
3.1.3.2 Tertiärantikörper und Detektionssysteme	49
3.1.3.3 Immunhistologischer Nachweis von OMP (<i>Olfactory marker protein</i>)	49

3.1.3.4	Immunhistologischer Nachweis von DCX (<i>Doublecortin</i>)	51
3.1.3.5	Immunhistologischer Nachweis von PCNA (<i>Proliferating cell nuclear antigen</i>)	52
3.1.3.6	Immunhistologischer Nachweis von TrkA (Tyrosinkinase-Rezeptor-A)	52
3.1.3.7	Immunhistologischer Nachweis weiterer Marker	53
3.1.3.8	Semiquantitative Auswertung der Immunhistologie	54
3.1.4	Immunhistologische Untersuchung der Rattennase	55
3.1.5	Statistische Datenanalyse der Charakterisierung des olfaktorischen Epithels	56
3.2	EXPERIMENTELLE INTRANASALE INFEKTION VON LEWIS-RATTEN	56
3.2.1	Herstellung der Virussuspension und der Mock-Gehirnsuspension	56
3.2.1.1	Versuchstiere	56
3.2.1.2	Versuchsbedingungen	57
3.2.1.3	BDV-Infektion	57
3.2.1.4	Euthanasie und Sektion	57
3.2.1.5	Herstellung der Virussuspension	58
3.2.2	Intranasale Infektion adulter Lewis-Ratten	58
3.2.2.1	Versuchstiere	58
3.2.2.2	Versuchsbedingungen für die <i>In-vivo</i> -Versuche	58
3.2.2.3	BDV-Infektion der Versuchstiere	58
3.2.2.4	Mock-Infektion	59
3.2.2.5	Euthanasie und Sektion	59
3.2.2.6	Gewinnung und Aufarbeitung des Probenmaterials	59
3.2.3	Histopathologische Untersuchung der Versuchstiere	61
3.2.3.1	H&E-Färbung von Gehirn und Nase der Versuchstiere	61
3.2.3.2	Auswertung	61
3.2.4	Immunhistologische Untersuchung der Versuchstiere	61
3.2.4.1	Immunhistologischer Nachweis von BDV-N	61
3.2.4.2	Auswertung der Immunhistologie	62
3.2.5	Immunhistologische Untersuchung des <i>Proliferating cell nuclear antigen</i> (PCNA) bei BDV-infizierten und Mock-infizierten Lewis-Ratten	63
3.2.5.1	Auswertung	63
3.2.6	<i>In-situ</i> -Hybridisierung der Versuchstiere (ISH)	63
3.2.6.1	Sondenherstellung	64
3.2.6.2	Durchführung der ISH zum Nachweis der viralen RNA	67
3.2.6.3	ISH der Nasen und Gehirne der intranasal infizierten Ratten	68
3.2.6.4	Auswertung der ISH	68
3.2.7	Statistische Datenanalyse der <i>In-vivo</i> -Infektionsversuche	69
3.3	DISSOZIATIONSKULTUR DES OLFAKTORISCHEN EPITHELIS	70
3.3.1	Etablierung der Dissoziationskultur des olfaktorischen Epithels	70
3.3.1.1	Beschichtung der Deckgläschen	70
3.3.1.2	Kulturbedingungen	71
3.3.1.3	Präparation der Dissoziationskultur	71
3.3.2	Charakterisierung der Dissoziationskultur	73
3.3.2.1	Reaktionsbedingungen der Immunfluoreszenz	73
3.3.2.2	Indirekte Immunfluoreszenz zur Darstellung der olfaktorischen Neurone	74
3.3.2.3	Indirekte Immunfluoreszenz zur Darstellung nicht-neuronaler Zellen	75

3.3.2.4	Quantifizierung ausgewählter zellulärer Komponenten	76
3.3.2.5	Auswertung	76
3.3.4	BDV-Infektion der Dissoziationskultur	76
3.3.4.1	BDV-Infektion	76
3.3.4.2	Indirekte Immunfluoreszenz (IF) zum Nachweis von BDV-N	77
3.3.4.3	Auswertung der BDV-Infektion	77
3.3.4.4	Doppelmarkierung zum Nachweis von β III-Tubulin und BDV-N	77
3.4	ORGANOTYPISCHEN GEWEBEKULTUR DES OLFAKTORISCHEN EPITHELS	78
3.4.1	Etablierung der organotypischen Gewebekultur	78
3.4.1.1	Kulturbedingungen	78
3.4.1.2	Präparation	79
3.4.2	BDV-Infektion der organotypischen Gewebekultur	79
3.4.2.1	Infektion	79
3.4.2.2	Immunhistologischer Nachweis von BDV-N	79
3.4.2.3	<i>In-situ</i> -Hybridisierung zum Nachweis viraler RNA	80
3.5	CO-KULTUR AUS OLFAKTORISCHEM EPITHEL UND OLFAKTORISCHEN HÜLLZELLEN	80
3.5.1	Kulturbedingungen der OECs	80
3.5.1.1	Beschichtung der Zellkulturflaschen	80
3.5.2	BDV-Infektion der OECs	81
3.5.2.1	BDV-Infektion	81
3.5.2.2	Indirekte Immunfluoreszenz zum Nachweis von BDV-N	81
3.5.2.3	Auswertung	81
3.5.3	Co-Kultur aus olfaktorischem Epithel und OECs	81
3.5.3.1	Kulturbedingungen	82
3.5.3.2	Präparation der Co-Kultur	82
3.5.3.3	BDV-Infektion der Co-Kultur	83
3.5.4	Nachweis von viraler RNA mittels quantitativer <i>real time</i> RT-PCR (qPCR)	83
3.5.4.1	RNA-Isolierung	83
3.5.4.2	RT-Reaktion	85
3.5.4.3	Quantitative <i>real time</i> Polymerase Kettenreaktion (qPCR)	88
4.	ERGEBNISSE	92
4.1	CHARAKTERISIERUNG DES OLFAKTORISCHEN EPITHELS DES PFERDES	92
4.1.1	Lokalisation des olfaktorischen Epithels in der Pferdenase	92
4.1.1.1	Quantitative Auswertung des Anteils des olfaktorischen Epithels	93
4.1.2	Verteilung der verschiedenen Typen des olfaktorischen Epithels	96
4.1.2.1	Quantitative Auswertung des Anteils der verschiedenen Epitheltypen	97
4.1.3	Immunhistologische Untersuchung des olfaktorischen Epithels und statistische Auswertung	104
4.1.3.1	<i>Olfactory marker protein</i> (OMP)	104
4.1.3.2	<i>Doublecortin</i> (DCX)	106
4.1.3.3	<i>Proliferating cell nuclear antigen</i> (PCNA)	110
4.1.3.4	Tyrosinkinase-Rezeptor-A (TrkA)	111
4.1.4	Immunhistologische Untersuchung der verschiedenen Typen des olfaktorischen Epithels	114

4.1.4.1	Übergreifende statistische Auswertung	115
4.1.4.2	Weitere immunhistologische Marker.....	116
4.1.5	Vergleichende immunhistologische Untersuchung des olfaktorischen Epithels der Ratte.....	118
4.2	EXPERIMENTELLE INTRANASALE BDV-INFEKTION VON LEWIS-RATTEN.....	119
4.2.1	Klinik.....	119
4.2.2	Histopathologische Befunde.....	120
4.2.3	Immunhistologischer Nachweis von BDV-N	120
4.2.3.1	Kinetik des Nachweises von BDV-N in der Nase.....	121
4.2.3.2	Nachweis von BDV-N im Gehirn.....	123
4.2.3.3	Negativkontrollen der Immunhistologie.....	124
4.2.4	Nachweis von BDV-N mRNA und genomischer RNA mittels <i>In-situ</i> -Hybridisierung.....	124
4.2.4.1	Reaktionsmuster der <i>In-situ</i> -Hybridisierung	125
4.2.4.2	Kinetik des Nachweises von BDV-N mRNA und viraler genomischer RNA im olfaktorischen Epithel	125
4.2.4.3	Nachweis von viraler genomischer RNA und BDV-N mRNA im Gehirn	130
4.2.4.4	Negativkontrollen der <i>In-situ</i> -Hybridisierung	131
4.2.5	Übergreifende statistische Auswertung der <i>In-vivo</i> -Infektionsversuche	132
4.2.6	Nachweis von Proliferationsmarkern im olfaktorischen Epithel	133
4.2.6.1	Reaktionsmuster	134
4.2.6.2	Gegenüberstellung der Proliferationsrate in BDV- und Mock-infizierten Tieren.....	134
4.3	DISSOZIATIONSKULTUR DES OLFAKTORISCHEN EPITHELS	136
4.3.1	Charakterisierung der Dissoziationskultur	136
4.3.1.1	Zellmorphologie in der nativen Kultur	136
4.3.1.2	Reaktionsmuster der olfaktorischen Neurone	137
4.3.1.3	Reaktionsmuster nicht-neuronaler Zellen	138
4.3.1.4	Quantifizierung ausgewählter zellulärer Komponenten	139
4.3.2	BDV-Infektion der Dissoziationskultur	140
4.3.2.1	Indirekte Immunfluoreszenz zum Nachweis von BDV-N	140
4.3.2.2	Nachweis BDV-infizierter olfaktorischer Neurone	142
4.4	ORGANOTYPISCHE GEWEBEKULTUR DES OLFAKTORISCHEN EPITHELS	143
4.4.1	Charakterisierung der organotypischen Gewebekultur	143
4.4.2	BDV-Infektion der organotypischen Gewebekultur.....	144
4.4.2.1	Immunhistologischer Nachweis von BDV-N	144
4.4.2.2	Nachweis von viraler genomischer RNA und BDV-N mRNA mittels <i>In-situ</i> -Hybridisierung	145
4.5	CO-KULTUR AUS OLFAKTORISCHEM EPITHEL UND OLFAKTORISCHEN HÜLLZELLEN	146
4.5.1	BDV-Infektion der olfaktorischen Hüllzellen	146
4.5.2	BDV-Infektion der Co-Kultur der olfaktorischen Hüllzellen und der Dissoziationskultur des olfaktorischen Epithels.....	147
4.5.2.1	Zusammenfassung der Reaktionsbedingungen der quantitativen <i>real time</i> RT-PCR (qPCR)	147

4.5.2.3 Nachweis viraler genomischer und BDV-N mRNA mittels quantitativer <i>real time</i> RT-PCR.....	148
4.5.2.4 Zusammenfassender Vergleich	152
5. DISKUSSION	154
5.1 CHARAKTERISIERUNG DES OLFAKTORISCHEN EPITHELDES DES PFERDES	154
5.1.1 Lokalisation des olfaktorischen Epithels in der Pferdenase	154
5.1.2 Verteilung der Typen des olfaktorischen Epithels des Pferdes	156
5.1.3 Immunhistologische Untersuchung des olfaktorischen Epithels des Pferdes	158
5.1.4 Immunhistologische Untersuchung der Typen des olfaktorischen Epithels	162
5.1.5 Speziesübergreifende Betrachtung	164
5.2 INITIALE PHASE DER INFEKTION NACH INTRANASALER BDV-INFEKTION VON LEWIS-RATTEN	167
5.2.1 Klinik und Histopathologie	167
5.2.2 Nachweis von BDV-N	168
5.2.3 Nachweis von viraler genomischer RNA und BDV-N mRNA	170
5.2.4 Korrelation des Nachweises von BDV-N, korrespondierender mRNA und genomischer RNA	172
5.2.5 Proliferation des olfaktorischen Epithels.....	175
5.3 DISSOZIATIONSKULTUR DES OLFAKTORISCHEN EPITHELDES	175
5.3.1 Charakterisierung der Dissoziationskultur	175
5.3.2 BDV-Infektion der Dissoziationskultur des olfaktorischen Epithels	178
5.4 ORGANOTYPISCHE GEWEBEKULTUR DES OLFAKTORISCHEN EPITHELDES	179
5.4.1 Charakterisierung der organotypischen Gewebekultur	179
5.4.2 BDV-Infektion der organotypischen Gewebekultur.....	180
5.5 CO-KULTUR AUS OLFAKTORISCHEM EPITHEL UND OLFAKTORISCHEN HÜLLZELLEN	180
5.5.1 Nachweis von BDV-N	180
5.5.2 Quantifizierung von BDV-RNA	182
5.6 SCHLUSSBETRACHTUNG	184
6. ZUSAMMENFASSUNG / SUMMARY	187
6.1 ZUSAMMENFASSUNG	187
6.2 SUMMARY	190
7. LITERATURVERZEICHNIS	194
8. ANHANG	226
8.1 LÖSUNGEN UND PUFFER.....	226
8.1.1 Histologie	226
8.1.2 Immunhistologie und Immunfluoreszenz	226
8.1.3 Sondenherstellung und <i>In-situ</i> -Hybridisierung.....	227
8.2 BEZUGSQUELLEN.....	231
8.3 TABELLEN.....	235
8.3.1 Charakterisierung des olfaktorischen Epithel des Pferdes	235
8.3.2 Experimentelle intranasale Infektion von Lewis-Ratten.....	242
8.3.3 Dissoziationskultur des olfaktorischen Epithels.....	251
8.3.4. Co-Kultur aus olfaktorischem Epithel und olfaktorischen Hüllzellen.....	252

8.4 ABKÜRZUNGEN..... 253

1. EINLEITUNG

Der Geruchssinn der Säugetiere und des Menschen stellt einen wichtigen Baustein der Sinnesphysiologie dar. Während er beim Menschen, im Vergleich zum Hören und Sehen, meist als weniger bedeutsam eingeschätzt wird, ist er für die meisten Tiere überlebenswichtig (NIIMURA, 2009; PATEL und PINTO, 2014).

Das olfaktorische Epithel (OE) beherbergt die Riechnervenzellen, die mit spezifischen olfaktorischen Rezeptoren ausgestattet sind und ist der einzige Bereich des Körpers, in dem Nervenzellen in direktem Kontakt zur Umwelt stehen. Die olfaktorischen Neurone stellen dadurch eine mögliche Eintrittspforte für viele neurotrope Viren dar, die über olfaktorische Leitungsbahnen ins zentrale Nervensystem (ZNS) gelangen können. Folglich sind sie eine wichtige Determinante für eine Weiterleitung von Krankheitserregern oder anderen schädlichen Substanzen ins Gehirn. Für eine Vielzahl von Viren, darunter das Vesikuläre Stomatitis Virus (VSV), das Herpes simplex Virus (HSV), das Tollwut-Virus und das Influenza-A-Virus, ist dies seit langem bekannt (Übersicht bei MORI *et al.*, 2005b). Schon früh konnte gezeigt werden, dass sich auch das Virus der Bornaschen Krankheit (Borna disease virus, BDV) im Rattenmodell ausgehend vom Riechnerv intraaxonal und transsynaptisch in das ZNS ausbreiten kann (MORALES *et al.*, 1988).

Neben Viren können jedoch auch andere potentiell schädliche Stoffe über das Riechepithel aufgenommen werden und ins Gehirn gelangen (zusammengefasst in DOTY, 2008). Und auch bei bestimmten Erkrankungen, wie beispielsweise bei der Parkinsonschen- oder der Alzheimerschen-Krankheit, spielt das olfaktorische Epithel eine wichtige Rolle, da diese Erkrankungen häufig mit dem Verlust des Geruchssinns einher gehen (DOTY, 2009; BENARROCH, 2010; HOLBROOK *et al.*, 2011). Daneben kann im Riechepithel eine lebenslange Neurogenese und ein Ersatz der Riechnervenzellen nach experimentell verursachten Läsionen beobachtet werden, was es zu einem begehrten Studienobjekt der regenerativen Medizin macht (GRAZIADEI und GRAZIADEI, 1979; GRAZIADEI und MONTI GRAZIADEI, 1983; MACKAY-SIM und KITTEL, 1991).

Trotz dieser Relevanz, insbesondere auch für Säugetiere, ist bislang nur wenig gesichertes Wissen über Struktur und Funktion des olfaktorischen Epithels in unseren Haus- und Nutztieren vorhanden. So sind über das olfaktorische System des Pferdes bisher nur vereinzelt Studien durchgeführt worden (GARCIA-SUAREZ *et al.*, 1997; KUMAR *et al.*, 2000; MILLER *et al.*, 2003). Im Gegensatz dazu ist das Riechepithel der Ratte bestens charakterisiert. Durch die Untersuchung der Zytoarchitektur und der Proteinexpression auf zellulärer Ebene lassen sich speziesübergreifende Gemeinsamkeiten und Unterschiede offenlegen. Damit kann untersucht werden, ob mögliche gleichartige intranasale Infektionswege bei verschiedenen Spezies vorliegen können. Damit können auch

Rückschlüsse von den im Tierversuch mit Nagern gewonnenen Erkenntnissen auf die Infektion anderer Spezies gezogen werden. Dies ist von besonderem Interesse, da die intranasale Infektionsroute des BDV auch für das Pferd angenommen wird.

Ein Ziel dieser Arbeit war daher die detaillierte morphologische Charakterisierung des olfaktorischen Epithels des Pferdes, dem Haupt- bzw. Fehlwirt des neurotrophen Bornavirus und der Vergleich mit dem olfaktorischen Epithel der Ratte, einem seit langem genutzten Tiermodell zum Studium der Bornaschen Krankheit (*Borna disease*, BD).

Außerdem sollte in dieser Arbeit die initiale Phase der Infektion mit dem BDV eingehend untersucht werden, um die Zielzellen des olfaktorischen Epithels zu identifizieren, die zuerst infiziert werden und von denen sich das Virus weiter in das ZNS ausbreitet. Das Anfangsstadium der Infektion ist heute, auch nach jahrzehntelanger Forschung, nur unzureichend charakterisiert. Es konnte beispielsweise bisher nicht sicher ausgemacht werden, ob es mehrere mögliche intranasale Eintrittspforten des Virus gibt. Diese könnten jedoch die Unterschiede in der Empfänglichkeit verschiedener Tierspezies für das BDV erklären (IHLENBURG, 1962; ALTMANN *et al.*, 1976; LUNDGREN *et al.*, 1993; RICHT *et al.*, 1997b). Daneben war auch die Frage, ob eine initiale Virusreplikation im olfaktorischen Epithel für eine erfolgreiche Virusausbreitung ins Gehirn notwendig ist, nicht beantwortet und war daher Ziel der vorliegenden Arbeit. Diese Wissenslücken über die Initialphase der Infektion und die neurogene Ausbreitung im Wirt sollten geschlossen werden, da dies eine wichtige Voraussetzung ist, um zukünftig effiziente Prophylaxe- und Therapiemaßnahmen entwickeln zu können.

Im Rahmen der Untersuchung der initialen Phase der BDV-Infektion sollten außerdem *In-vitro*-Modelle entwickelt werden, die sich als Ersatzmethode zu Tierversuchen eignen. Zwar existieren viele Zellkultursysteme, die mit dem BDV infizierbar sind (HERZOG und ROTT, 1980), allerdings handelt es sich hierbei meist um persistent infizierte Zelllinien, die physiologischerweise nicht als Eintrittspforte für das BDV dienen können.

2. LITERATURÜBERSICHT

2.1 VIRALE EINTRITTSFORTHEN UND STRATEGIEN ZUR AUSBREITUNG INS ZNS

Viele tier- und humanpathogene Viren weisen einen Neurotropismus auf und gelangen über den Blutweg oder periphere Nerven in das ZNS. Die meisten Viren, die sich hämatogen ausbreiten, sind dabei auf die zellulären Bestandteile des Bluts angewiesen. Die Blut-Hirnschranke stellt eine natürliche Barriere zwischen Blut und Gehirngewebe dar und verhindert über kontinuierliche Endothelien und Tight Junctions bis zu einem gewissen Maß das Übertreten von Entzündungszellen und einiger Proteine (WILSON *et al.*, 2010; SCHWERK *et al.*, 2015). Verschiedene Mechanismen sind beschrieben, wie Viren diese Barriere überwinden können. Sie können über infizierte Leukozyten aus den Blutgefäßen auswandern, Endothelzellen der Blutgefäße im ZNS direkt infizieren, über Transmitter die Permeabilität der Blut-Hirnschranke erhöhen oder über den Plexus choroideus mit dem fenestrierten Endothel in den Liquor gelangen. Daneben stellt die Fortleitung über sensorische und motorische Neurone eine wichtige Infektionsroute dar (Übersicht bei MCGAVERN und KANG, 2011). Hierbei nimmt die Infektion über die olfaktorischen Neurone eine Sonderstellung ein, da die Riechnervenzellen die einzigen Neurone sind, die beim Säugetier in direktem Kontakt zur Umwelt stehen und in Epithelform organisiert sind (GRAZIADEI und GRAZIADEI, 1979). Sie können folglich direkt und ohne Gewebsschädigung mit Viren in Kontakt kommen. Darüber hinaus gibt es einige Viren, die verschiedene Wege nutzen können, um ins Gehirn zu gelangen.

2.1.1 Hämatogene Infektion des ZNS

2.1.1.1 Infektion von Endothelzellen

In der Regel kann durch die Blut-Hirnschranke der Übertritt von Viren ins ZNS verhindert werden. Ein Mechanismus, um diese zu überwinden ist am Beispiel des Humanen T-lymphotropen Virus-1 (HTLV-1) zu finden. Dieses Virus der Familie der *Retroviridae* kann in einem kleinen Anteil der infizierten Menschen neben der sogenannten Adulten T-Zell-Leukämie auch die HTLV-1-assoziierte Myelopathie auslösen (GESSAIN *et al.*, 1985). Das Virus bindet an eine Reihe von Rezeptoren, darunter an den Glukosetransporter GLUT1, an Neuropilin 1, einen Co-Rezeptor eines Tyrosinkinase-Rezeptors, und an Heparansulfat-Proteoglykane der Zellmembran, die von Endothelzellen des Rückenmarks exprimiert werden. Folglich hat das Virus das Potential das Endothel selbst zu infizieren, um von dort aus direkt ins ZNS zu gelangen (AFONSO *et al.*, 2008). Dieser Mechanismus wird auch als

eine Determinante des Neurotropismus einiger Stämme des Maus Hepatitis Virus (MHV), Familie *Coronaviridae*, diskutiert. Die Expression des spezifischen Rezeptors, *Carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 1a* (CAECAM1a), das von MHV genutzt wird, ist im Gegensatz zu Zellen in Leber und Darm nicht in Zellen des ZNS nachweisbar (GODFRAIND *et al.*, 1995). Jedoch konnte es auf den Endothelien von Blutgefäßen des ZNS nachgewiesen werden, die infiziert werden konnten (GODFRAIND *et al.*, 1997). In neueren Untersuchungen wurde allerdings gezeigt, dass sich die stark neurotrophen Stämme sogar in Neuronen von CAECAM1a-knockout-Mäusen ausbreiten können (MIURA *et al.*, 2008), was dafür spricht, dass weitere Faktoren eine Rolle spielen dürften (COWLEY und WEISS, 2010; PHILLIPS und WEISS, 2011). Eine wichtige Funktion scheinen dabei neutrophile Granulozyten zu haben, die eine erhöhte Durchlässigkeit der Blut-Hirnschranke über die Sekretion von Matrix-Metalloproteinasen verursachen (ZHOU *et al.*, 2003; WEINGER *et al.*, 2013).

2.1.1.2 Permeabilitätsstörung der Blut-Hirnschranke

Ein weiterer Mechanismus zur Überwindung der Blut-Hirnschranke kann die durch Viren ausgelöste Zytokinausschüttung sein, welche Einfluss auf die Funktionsfähigkeit dieser Barriere hat. Für das West-Nil-Virus, einem Vertreter der Familie der *Flaviviridae*, konnte gezeigt werden, dass es durch einen Anstieg von TNF- α und IL-6 im Blut zu einer erhöhten Permeabilität der Blut-Hirnschranke kommt (WANG *et al.*, 2004). In der Regel geht eine Infektion mit grippeähnlichen Symptomen einher oder verläuft asymptomatisch. Gelangt das Virus jedoch über den beschriebenen Mechanismus in das Gehirn, kann es zu einer letalen Meningoenzephalitis kommen (CAMPBELL *et al.*, 2002; WANG *et al.*, 2004).

2.1.1.3 Leukozytenmigration (*leukocyte trafficking*)

Ein Mechanismus, der in der Literatur als *Trojan horse mechanism* bezeichnet wurde (Übersicht bei SALINAS *et al.*, 2010; MCGAVERN und KANG, 2011), beschreibt das Phänomen, dass Viren in weißen Blutzellen die Blut-Hirnschranke passieren. Dieser Mechanismus ist unter anderem beim Humanen Immundefizienz-Virus (HIV) (ALEXAKI und WIGDAHL, 2008) und beim Simian Immundefizienz-Virus (SIV; CLAY *et al.*, 2007), beides Lentiviren in der Familie der *Retroviridae*, für Monozyten vorzufinden. Welche Rolle CD4+ Zellen, die ebenfalls im Rahmen einer HIV-Infektion im ZNS zu finden sein können, am Krankheitsgeschehen spielen, ist bislang strittig (zusammengefasst bei SPUDICH und GONZALEZ-SCARANO, 2012).

2.1.1.4. Übertritt von Viren über den Plexus choroideus

Im Gegensatz zu den kontinuierlichen Endothelien der Mikrozirkulation des ZNS weist der Plexus choroideus fenestrierte Endothelien auf und erleichtert so Viren und anderen infektiösen Agenzien den Übertritt in die Cerebrospinalflüssigkeit (CSF) und damit die Ausbreitung in das Gehirn (SCHWERK *et al.*, 2015). Dies konnte für viele Lentiviren der Familie der *Retroviridae* gezeigt werden, so zum Beispiel bei dem Felinen Immundefizienz-Virus (FIV; MEEKER *et al.*, 2012) sowie dem SIV (CLAY *et al.*, 2007). Dies wird auch für das Maedi-Visna-Virus (MVV) angenommen, das ebenfalls zu den Lentiviren gehört (GEORGSSON, 1994). In diesen Fällen ist der Übertritt von virustragenden Leukozyten in das ZNS erleichtert. Daneben konnte am Beispiel von HIV und MVV gezeigt werden, dass Zellen des Plexus selbst infiziert werden (NARAYAN *et al.*, 1977; FALANGOLA und PETITO, 1993; FALANGOLA *et al.*, 1995; LIST und HAASE, 1997) und so als Virusreservoir fungieren können (HANLY und PETITO, 1998).

2.1.2 Neurogene Infektion des ZNS

2.1.2.1 Eintritt über sensorische Nerven

Die weit verbreiteten α -Herpesviren repräsentieren ein wichtiges Beispiel für Viren, die über sensorische Nerven der Peripherie ins ZNS gelangen können. Als die am besten charakterisierten Vertreter sind die Herpes-simplex-Viren (HSV) des Menschen zu nennen, die neben den typischen Herpesläsionen der Haut und Schleimhaut auch Enzephalitiden auslösen können. Als Eintrittspforte dienen hauptsächlich Epithelzellen der Schleimhäute und der mukokutanen Übergänge, von denen sie über sensorische Nervenenden intraaxonal und transsynaptisch zum Trigemininalganglion (HSV-1) oder zu den Sakralganglien (HSV-2) weitergeleitet werden. Der zelluläre Rezeptor auf den sensorischen Nervenendigungen ist dabei Nektin-1 (SHUKLA *et al.*, 2006; CURANOVIC und ENQUIST, 2009; SALINAS *et al.*, 2010; MCGAVERN und KANG, 2011). Dies gilt beispielsweise auch für das veterinärmedizinisch relevante Suid Herpesvirus-1, dem Erreger der anzeigepflichtigen Aujeszky'schen Krankheit (YOON und SPEAR, 2002). Daneben nutzt auch das Herpesvirus simiae (Herpesvirus B), das regelmäßig bei Affen der Gattung *Macaca* gefunden wird, den Rezeptor Nektin-1 (FAN *et al.*, 2012).

2.1.2.2 Eintritt über motorische Nerven

Das Tollwut-Virus ist ein klassisches Beispiel für ein Virus, das durch periphere motorische Nerven ins ZNS weitergeleitet wird. Es ist ein Lyssavirus und gehört zur Familie der

Rhabdoviridae in der Ordnung der *Mononegavirales*. Zelluläre Rezeptoren für dieses Virus sind der nikotinerge Acetylcholin-Rezeptor und das *Neural cell adhesion molecule* (NCAM) (BURRAGE *et al.*, 1985; THOULOZE *et al.*, 1998). Diese Rezeptoren an der Nervenendigung der neuromuskulären Endplatte können beispielsweise durch den Biss eines infizierten Tieres mit dem Virus in Kontakt kommen und nach erfolgter transsynaptischer und retrograd intraaxonaler Weiterleitung in das ZNS eine nicht-eitrige Enzephalitis auslösen. Neben diesem klassischen Infektionsweg ist auch eine Infektion über olfaktorische Leitungsbahnen beschrieben (siehe 2.1.2.3).

Auch Polioviren nutzen die neuromuskuläre Endplatte und motorischen Nerven um ins ZNS zu gelangen. Sie sind die Erreger der *Poliomyelitis epidemica anterior acuta*, und gehören zu den Enteroviren der Familie der *Picornaviridae* in der Ordnung *Picornavirales*. Nach erfolgter oraler Aufnahme und Virusvermehrung im Darm kommt es zur Infektion der regionären Lymphknoten und zur transienten Virämie. Über den Blutweg gelangt das Virus auch in die Zellen der Skelettmuskulatur und an Nervenendigungen der neuromuskulären Endplatte. Dort binden sie an den Rezeptor CD155 auf der neuronalen Zellmembran und breiten sich von dort aus transsynaptisch und intraaxonal retrograd ins ZNS aus (LEON-MONZON *et al.*, 1995; OHKA *et al.*, 2004; RACANIELLO, 2006; SALINAS *et al.*, 2010).

Darüber hinaus nutzen Adenoviren der Familie *Adenoviridae* den Coxsackievirus-Adenovirus-Rezeptor (CAR) um in die Nervenendigungen der neuromuskulären Endplatte einzudringen. Dies konnte auch am Beispiel des Caninen Adenovirus-2 (CAV-2) gezeigt werden (SOUDAIS *et al.*, 2001; SALINAS *et al.*, 2009).

2.1.2.3 Intranasale Infektion des ZNS über olfaktorische Leitungsbahnen

Viele neurotrope Viren, darunter zahlreiche Vertreter der Ordnung *Mononegavirales*, können auch über olfaktorische Leitungsbahnen in das ZNS gelangen (WINKLER *et al.*, 1973; CONOMY *et al.*, 1977; CARBONE *et al.*, 1987; MORALES *et al.*, 1988). Dieser mögliche Infektionsweg zeichnet sich dadurch aus, dass die olfaktorischen Neurone in direkten Kontakt zur Umwelt stehen und die Viren so eine direkte Zugangsmöglichkeit zum ZNS haben.

Für das BDV, dem Erreger der Bornaschen Krankheit, einem Vertreter der Ordnung *Mononegavirales*, wird angenommen, dass es sich bei der intranasalen Infektion um die Hauptinfektionsroute der natürlichen Wirte, Pferd und Schaf, handelt. So konnte in Studien eine Ausbreitung der Infektion ins ZNS nach intranasaler Virusapplikation im Rattenmodell festgestellt werden (MORALES *et al.*, 1988; SHANKAR *et al.*, 1992). Außerdem konnte in der Arbeit von Morales *et al.* (1988) gezeigt werden, dass Muttertiere von ihren am ersten Lebenstag infizierten Nachkommen infiziert werden können, da diese große Mengen an

infektiösem Virus mit Tränenflüssigkeit, Speichel und Urin ausscheiden. Sowohl die klinischen als auch die histologischen Veränderungen glichen dabei denen der intranasalen Infektion der adulten Ratten. Letzteres konnte in einer weiteren Studie bestätigt werden (SAUDER und STAEHELI, 2003). Hier wurde gezeigt, dass infektiöser Urin, der von persistent infizierten Ratten gewonnen wurde, in der Lage war, adulte Artgenossen anzustecken. Experimentell können, neben der intrazerebralen Injektion, auch andere Infektionswege zu einer Infektion des ZNS führen, wobei jedoch ein intraaxonaler retrograder und transsynaptischer Transportweg für eine erfolgreiche Ausbreitung angenommen wird (CARBONE *et al.*, 1987).

Auch α -Herpesviren, darunter das humane Herpes-simplex-Virus 1 und 2 können diese Eintrittspforte nutzen (TWOMEY *et al.*, 1979; MORI *et al.*, 2005a; MORI *et al.*, 2005b). Hinweise hierauf ergaben sich durch den Nachweis von Viren im olfaktorischen Cortex und im limbischen System und nicht in Bereichen, die bei einer trigeminalen Fortleitung zu erwarten gewesen wären (ESIRI, 1982). Außerdem konnten histologische Veränderungen (TWOMEY *et al.*, 1979) oder virales Antigen nach experimenteller Infektion (TAN und STEVENSON, 2014) im Riechepithel nachgewiesen werden. HSV-1 und -2 besitzen zusätzlich bei der experimentellen Infektion von Mäusen die Fähigkeit die chemosensorischen Neurone des Vomeronasalorgans zu infizieren (MORI *et al.*, 2005a). Das HSV-1 konnte hier allerdings auch im tributären Gebiet des *Nervus trigeminus* nachgewiesen werden. Das HSV-2 konnte nach experimenteller Infektion hingegen nur in den Bereichen gefunden werden, die für eine Weiterleitung vom *Nervus trigeminus* in das ZNS sprechen (MORI *et al.*, 2005b).

Weitere Herpesviren, die in der Lage sind, diesen Infektionsweg zu nutzen, sind beispielsweise das Equine Herpesvirus-1, EHV-1, (THORSEN und LITTLE, 1975; MARSHALL und FIELD, 1997; WALTER *et al.*, 2013) sowie das Suid Herpesvirus-1, dem Erreger der Aujeszky'schen Krankheit (NARITA *et al.*, 1991; MULDER *et al.*, 1994).

Kürzlich wurde für das Humane Herpesvirus Typ 6, Unterfamilie *Betaherpesvirinae* in der Familie der *Herpesviridae*, berichtet, dass es ebenfalls über olfaktorische Leitungsbahnen ins das ZNS gelangen kann und dass das olfaktorische Epithel ein Virusreservoir darstellen kann. Dies wurde damit begründet, dass *in vitro* olfaktorische Hüllzellen infizierbar sind und sich virales Erbgut aus Nasentupfern sowie aus verschiedenen Bereichen des olfaktorischen Traktes im Gehirn isolieren ließen (HARBERTS *et al.*, 2011). Ein abschließender Beweis für die ursächliche Beteiligung an den verschiedensten neurologischen Krankheiten, mit denen es in Verbindung gebracht wird (CHALLONER *et al.*, 1995; CASERTA *et al.*, 2001; FOTHERINGHAM und JACOBSON, 2005; CHAPENKO *et al.*, 2006; LI *et al.*, 2011; ALENDA *et al.*, 2014), steht allerdings noch aus (LEIBOVITCH und JACOBSON, 2014).

Aus der Familie der *Rhabdoviridae* in der Ordnung der *Mononegavirales* kann das Tollwut-Virus über das olfaktorische Epithel in das Gehirn gelangen. Dies konnte bereits in vielen experimentellen Studien mit Mäusen gezeigt werden (LAFAY *et al.*, 1991; ROSSEELS *et al.*, 2011). Daneben ist auch ein Fall einer Laborinfektion mit dem Tollwutvirus über Aerosole bekannt geworden. Der Virusnachweis gelang im Bulbus olfactorius (WINKLER *et al.*, 1973; CONOMY *et al.*, 1977).

Auch für verschiedene Stämme des *Mouse hepatitis virus* (MHV) konnte experimentell eine Infektion des ZNS nach intranasaler Virusapplikation gezeigt werden, was sich in einer Enzephalomyelitis oder Demyelinisierung äußern kann (BARTHOLD, 1988; PERLMAN *et al.*, 1989; COWLEY und WEISS, 2010).

Weiterhin kann auch das *Vesicular stomatitis virus*, das zur Gattung Vesiculovirus und ebenfalls zu der Familie der *Rhabdoviridae* gehört, in experimentellen Infektionen über das olfaktorische Epithel in das Gehirn gelangen (HUNEYCUTT *et al.*, 1993). Das Virus ist der Auslöser der anzeigepflichtigen Erkrankung *Stomatitis vesicularis*. Ob sich die Infektion im Gehirn ausbreitet, hängt von einem Interferon Typ I-vermittelten Mechanismus innerhalb des Bulbus olfactorius ab (DETJE *et al.*, 2009).

Aus der Familie der *Orthomyxoviridae* kann das Influenza-A-Virus über olfaktorische Leitungsbahnen in das zentrale Nervensystem gelangen, was experimentell belegt werden konnte (REINACHER *et al.*, 1983; ARONSSON *et al.*, 2003). Aber auch bei der natürlichen Infektion des Menschen, insbesondere bei Kindern, kann das Virus, wenn auch selten, ins ZNS gelangen und eine Enzephalitis oder Enzephalopathie auslösen (zusammengefasst von STUDAHL, 2003).

Der intranasale Infektionsweg konnte darüber hinaus für das Poliovirus zur experimentellen Infektion von Mäusen genutzt werden (NAGATA *et al.*, 2004). Beim Menschen scheint dieser Weg allerdings keine Rolle zu spielen (SABIN und WARD, 1941), obwohl dies seit Anfang des 20. Jahrhunderts diskutiert wird (FLEXNER und AMOSS, 1920).

Darüber hinaus wird spekuliert, dass Kanäle, die durch olfaktorische Hüllzellen gebildet werden und so direkten Kontakt zur Cerebrospinalflüssigkeit ermöglichen, eine Diffusion von Viren aus der Nase ins ZNS ermöglichen. Eine direkte Infektion der Hüllzellen mit Freisetzung der Viren in diese Kanäle wird als möglicher Mechanismus diskutiert (VAN RIEL *et al.*, 2015). Allerdings konnte dieser Weg noch nicht abschließend bewiesen werden und scheint vornehmlich beim Transport von Substanzen ins ZNS von Relevanz zu sein (OBERDORSTER *et al.*, 2004; DHURIA *et al.*, 2010; GIZURARSON, 2012).

2.1.3 Viren, die verschiedene Infektionswege nutzen

Neben den Viren, die hauptsächlich hämatogen oder neurogen den Weg ins ZNS nehmen, gibt es einige Viren, bei denen auch bei der natürlichen und experimentellen Infektion mehrere Wege sicher nachgewiesen sind. Hierzu gehören beispielsweise zwei Vertreter der Gattung Morbillivirus, die zur Familie der *Paramyxoviridae* in der Ordnung der *Mononegavirales* gehören.

Für das Masernvirus sind als zelluläre Rezeptoren das *Membrane cofactor protein* (MCP, CD46; DORIG *et al.*, 1993; NANICHE *et al.*, 1993), das *Signaling lymphocytic activation molecule* (SLAM, CD 150) für aktivierte Lymphozyten, Makrophagen und dendritische Zellen (TATSUO *et al.*, 2000) sowie Nektin-4, auch bekannt als polivirus-receptor-like-4 (PVRL4), auf epithelialen Zellen (MÜHLEBACH *et al.*, 2011; NOYCE *et al.*, 2011) bekannt. ZNS-Komplikationen können sich akut als Meningoenzephalitis (*acute postinfectious measles encephalitis*, APME) oder, als Spätfolge, in Form einer subakuten sklerosierende Panenzephalitis (*subacute sclerosing panencephalitis*, SSPE) äußern (GOLDBLOOM und KEITH, 1937; CONNOLLY *et al.*, 1967; REUTER und SCHNEIDER-SCHAULIES, 2010). Das Virus gelangt meist nach einer initialen Vermehrung in den lymphatischen Einrichtungen des Respirationstraktes in den Blutstrom zur Blut-Hirnschranke und überwindet diese durch *leukocyte trafficking*, Migration über den Plexus choroideus oder durch Infektion der Endothelzellen (KIRK *et al.*, 1991; DITTMAR *et al.*, 2008; LUDLOW *et al.*, 2009; SALINAS *et al.*, 2010).

Das *Canine distemper virus* (CDV) ist das ätiologische Agens der Staupe, an der eine Vielzahl von Carnivoren erkranken können. Auch für dieses Virus sind verschiedene Wege der Ausbreitung ins ZNS beschrieben (Übersicht bei BEINEKE *et al.*, 2009), wobei es sich nach einer initialen Virusvermehrung in lymphatischem Gewebe hauptsächlich hämatogen ins ZNS ausbreitet (KRAKOWKA *et al.*, 1987; KRAKOWKA, 1989). Ein definitiver zellulärer Rezeptor ist bislang nicht sicher identifiziert, insbesondere die Rolle von Nektin-4 und SLAM wurde kürzlich in Frage gestellt (ALVES *et al.*, 2015). Die Blut-Hirnschranke wird dabei durch auswandernde Leukozyten, hauptsächlich Monozyten überwunden. Wichtiger scheint für den Übertritt der Viren ins ZNS jedoch die Infektion der ependymalen und subependymalen Zellen sowie des Plexus choroideus zu sein (HIGGINS *et al.*, 1982; VANDEVELDE und ZURBRIGGEN, 2005). Des Weiteren wurde auch eine Weiterleitung aus den Meningen diskutiert (BAUMGÄRTNER *et al.*, 1989). Innerhalb des ZNS kann sich das CDV dann, unter anderem, auch über den Liquor cerebrospinalis ausbreiten (VANDEVELDE und ZURBRIGGEN, 2005; RUDD *et al.*, 2006). Neben der hämatogenen Ausbreitung kann das CDV auch über olfaktorische Bahnen ins Gehirn gelangen, was experimentell gezeigt werden konnte (RUDD *et al.*, 2006).

2.1.4 Aufnahme anderer potentiell schädlicher Agentien über das olfaktorische Epithel

Neben den unter 2.1.2.3 beschriebenen Viren können weitere Stoffe, die für den Körper potentiell schädlich sind, über das Riechepithel ins ZNS gelangen. Dazu zählen Lektine, Farbstoffe, Lösungsmittel, Metalle, Aminosäuren, Nanopartikel und andere Mikroorganismen. Zahlreiche ionisierte Metalle, darunter Aluminium, Cadmium, Gold und Mangan können sehr schnell vom olfaktorischen Epithel in das Gehirn transportiert werden (Übersicht bei DOTY, 2008). Zum Teil wird von einer Geschwindigkeit berichtet, die schneller als 2 mm pro Stunde ist (TJALVE und HENRIKSSON, 1999). Im ZNS stellen z.B. insbesondere die Astrozyten ein Ziel für Mangan dar, was in einer Studie mit Ratten gezeigt werden konnte (HENRIKSSON und TJALVE, 2000). Jedoch konnte abschließend nicht sicher beurteilt werden, ob dieses Metall einen schädigenden Einfluss auf die Astrozyten hat.

Im Hinblick auf die vielfach diskutierte Frage, ob Aluminium eine entscheidende Rolle bei der Entstehung der Alzheimerschen Krankheit spielt, liegen in der Literatur widersprüchliche Angaben vor. Dies gilt insbesondere für den Weg der Aufnahme und in welcher Form das Aluminium vorliegen muss um eine Erkrankung hervorzurufen (Übersicht bei BROWN *et al.*, 2005). Auch das fehlgefaltete Protein PrP^{Sc}, wie es im Rahmen von spongiformen Enzephalopathien wie z.B. der Creutzfeld-Jakobschen Krankheit auftritt, ist häufig sowohl im olfaktorischen Epithel als auch im Riechkolben und den Riechbahnen des Gehirns zu finden, was die Vermutung zulässt, dass die olfaktorische Route als Eintrittspforte dienen kann (REUBER *et al.*, 2001; ZANUSSO *et al.*, 2003). Dies wurde auch am Beispiel einer natürlichen (CORONA *et al.*, 2009) oder einer experimentellen Scrapie-Erkrankung beim Schaf (HAMIR *et al.*, 2008) gezeigt. Wie auch bei der Alzheimerschen und der Parkinsonschen Krankheit (DOTY, 2009; BENARROCH, 2010; HOLBROOK *et al.*, 2011) kann es bei der Creutzfeld-Jakobschen Krankheit zu einem Verlust des Riechsinn kommen (ZANUSSO *et al.*, 2003). Daneben liegt ein Fallbereich vor, bei dem der Patient Riech- und Geschmackssinn verlor (REUBER *et al.*, 2001). Dies unterstreicht die Relevanz des olfaktorischen Epithels im Rahmen der Diagnostik von Erkrankungen.

2.2 AUFBAU DES OLFAKTORISCHEN EPITHELS

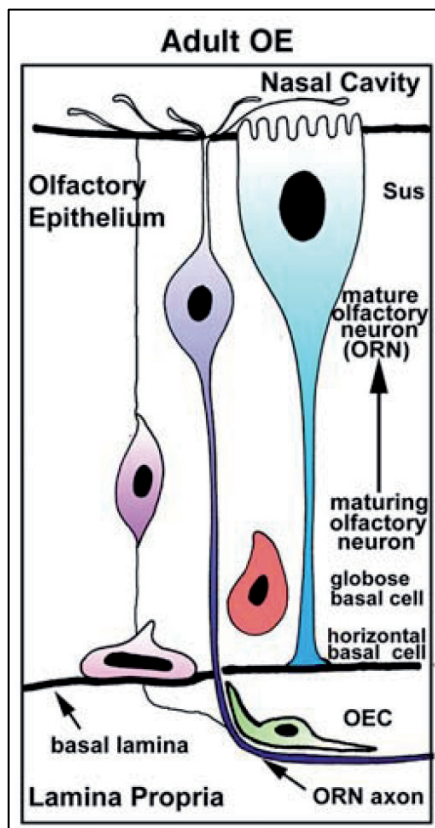
Das Geruchsorgan beziehungsweise die Riechschleimhaut nimmt eine tierartlich und individuell unterschiedlich große Fläche im Bereich des *Fundus nasi* ein. Das Epithel bedeckt zu unterschiedlichen Anteilen sowohl die Nasen- und Siebbeinmuscheln als auch Wandbereiche des Siebbeins (BARRIOS *et al.*, 2014b; BARRIOS *et al.*, 2014c; PATEL und PINTO, 2014). Bei dem olfaktorischen Epithel handelt es sich um ein einschichtiges und mehrreihiges Epithel, das aus drei Gruppen von Zellen besteht. Die Rezeptoren des

Geruchssinns befinden sich auf den zilienträgenden olfaktorischen Neuronen. Daneben finden sich im Epithel die basal gelegenen Basalzellen und die weiter apikal gelegenen Stützzellen. Unterhalb des Epithels schließt sich, getrennt durch die Basalmembran, die Lamina propria mucosae an (MORRISON und COSTANZO, 1992; MURDOCH und ROSKAMS, 2007; BARRIOS *et al.*, 2014a). Die Stützzellen zeigen eine leicht gelbliche Pigmentierung, wodurch die Regio olfactoria oft schon makroskopisch abgegrenzt werden kann (NICKEL *et al.*, 2004).

2.2.1 Zellen des olfaktorischen Epithels

Der Aufbau des olfaktorischen Epithels ist schematisch in Abb. 1 dargestellt.

Abb. 1: Schematische Darstellung des Aufbaus des adulten olfaktorischen Epithels (nach MURDOCH und ROSKAMS, 2007)



Adult OE: reifes olfaktorisches Epithel; *nasal cavity*: Nasenhöhle; *Sus*: sustentacular cell, Stützzelle; *mature olfactory neuron (ORN)*: adulte bzw. reife Riechnervenzelle; *maturing olfactory neuron*: juvenile bzw. unreife Riechnervenzelle; *globose basal cell*: proliferierende Basalzelle; *horizontal basal cell*: horizontale Basalzelle; *OEC*: olfactory ensheathing cell, olfaktorische Hüllzelle; *ORN axon*: Axon der Riechnervenzelle bzw. Nervenfasern

Ausgangspunkt für die Regenerationsfähigkeit des Epithels sind die Basalzellen (GRAZIADEI und GRAZIADEI, 1979; FARBMAN und MARGOLIS, 1980; GRAZIADEI und MONTI GRAZIADEI, 1983). Morphologisch können im postnatalen Epithel runde und horizontale Basalzellen unterschieden werden.

Die runden oder kugeligen, proliferierenden Basalzellen werden in der englischsprachigen Literatur als *globose basal cells* bezeichnet und gelten als Vorläufer der olfaktorischen Neurone (GRAZIADEI und GRAZIADEI, 1979; CALOF und CHIKARAISHI, 1989; MACKAY-SIM und KITTEL, 1991) und der Stützzellen (SCHWOB *et al.*, 1994; CHEN *et al.*, 2004). Sie sind im Epithel etwas weiter apikal als die direkt der Basalmembran aufliegenden horizontalen Basalzellen zu finden. Der Nachweis der Proliferation kann durch Einlagerungen von Bromdesoxyuridin (BrdU; CARTER *et al.*, 2004) oder [³H]-Thymidin (GRAZIADEI und GRAZIADEI, 1979) in die Zellen erfolgen. Der Nachweis ist auch immunhistologisch durch Detektion von PCNA (*Proliferating cell nuclear antigen*; MILLER *et al.*, 2003) und Ki-67 (CARTER *et al.*, 2004; BOCK *et al.*, 2009; HOLBROOK *et al.*, 2011) sowie von dem in einer Studie entwickelten Marker GBC-1 (*globose basal cells*; GOLDSTEIN und SCHWOB, 1996) möglich.

Den horizontalen Basalzellen wird meist die Funktion multipotenter Stammzellen zugesprochen, die für die Regeneration des Epithels nach Schäden zuständig sind (SCHWARTZ LEVEY *et al.*, 1991; HOLBROOK *et al.*, 1995; CARTER *et al.*, 2004). Sie exprimieren je nach Alter des Tieres neben Zytokeratin 5 und 6 (SCHWOB *et al.*, 1995) verschiedene Marker, darunter den Transkriptionsfaktor Pax-6 (DAVIS und REED, 1996), EGFR (*Epidermal growth factor receptor*; KRISHNA *et al.*, 1996), ICAM-1 (*Intercellular adhesion molecule-1*) sowie α_1 -, α_3 -, α_6 -, β_1 und β_4 -Integrin (CARTER *et al.*, 2004). Außerdem exprimieren sie den zur Familie der hochaffinen Tyrosinkinase-Rezeptoren gehörenden Rezeptor TrkA und können so durch NGF (*Nerve growth factor*) stimuliert werden (FERON *et al.*, 2008). Ob die horizontalen Basalzellen die Vorläufer der proliferierenden Basalzellen oder eine eigene Entität nicht-neuronaler Stammzellen darstellen, wird weiterhin diskutiert (CALOF und CHIKARAISHI, 1989; SCHWOB, 2002; CARTER *et al.*, 2004; MURDOCH und ROSKAMS, 2007).

Aus den proliferierenden Basalzellen entwickeln sich die juvenilen bzw. unreifen olfaktorischen Neurone (CALOF und CHIKARAISHI, 1989). Ihr Zellkern liegt in der Ebene zwischen den Zellkernen der proliferierenden Basalzellen und der adulten Neurone. Immunhistologisch ist dieser Zelltyp mittels Antiseren gegen den hochaffinen Tyrosinkinase Rezeptor TrkB (ROSKAMS *et al.*, 1996; FERON *et al.*, 2008) detektierbar. Daneben exprimieren sie das *Growth-associated phosphoprotein* GAP43 (VERHAAGEN *et al.*, 1990) und *Doublecortin* (DCX; CARSON *et al.*, 2006; MURDOCH und ROSKAMS, 2007).

Bei den reifen olfaktorischen Neuronen handelt es sich um bipolare Neurone mit einem lumenwärts gerichteten, unverzweigten Dendriten und einem zur Basallamina gerichteten Axon. An den Dendritenendungen findet sich eine charakteristische Auftreibung mit einer variablen Zahl an Zilien. Die Zellkerne dieses Zelltyps liegen weiter apikal als die der juvenilen Neurone, meist aber unterhalb der Zellkerne der Stützzellen (MORRISON und

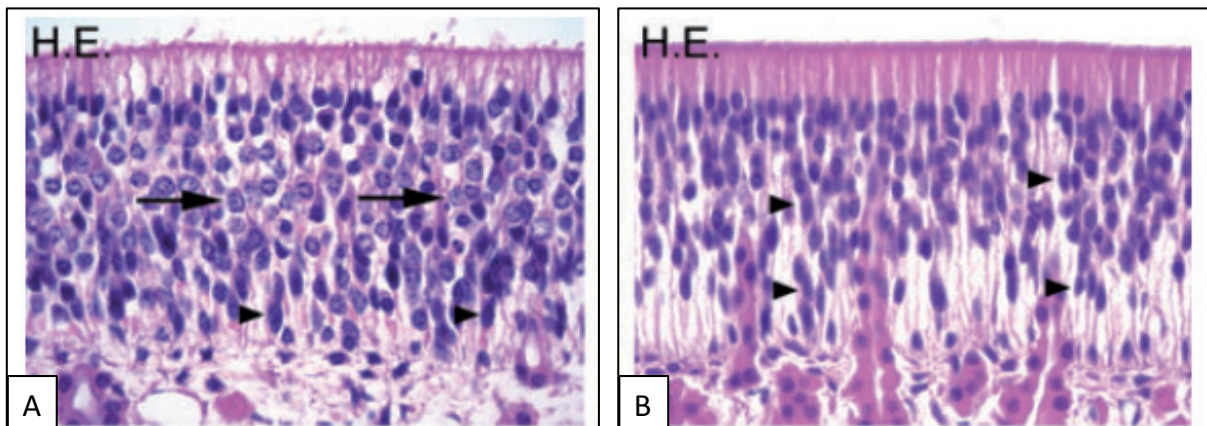
COSTANZO, 1992; MURDOCH und ROSKAMS, 2007). Der spezifischste Marker zur Darstellung adulter olfaktorischer Neurone ist das *Olfactory marker protein* OMP (HARTMAN und MARGOLIS, 1975; FARBMAN und MARGOLIS, 1980). Es handelt sich hierbei um ein Protein, das sowohl bei Säugetieren, Fischen und Fröschen als auch beim Menschen vorkommt (KELLER und MARGOLIS, 1975) und zwischen den verschiedenen Spezies konservierte Genomabschnitte aufweist (BUIAKOVA *et al.*, 1994). Beim Krallenfrosch sind allerdings zwei verschiedene Klone nachgewiesen worden, die sich im Bereich des C- und des N-Terminus von denen der Säugetiere unterscheiden (RÖSSLER *et al.*, 1998). Die genaue Funktion dieses Proteins ist bislang nicht bekannt, es gibt jedoch Hinweise darauf, dass es eine modulierende Funktion bei der Signaldetektion und der Signaltransduktion des Riechens inne hat (BUIAKOVA *et al.*, 1996; REISERT *et al.*, 2007). Weitere, wenn auch weniger spezifische, immunhistologische Marker zur Darstellung der adulten Neurone sind PGP9.5 (*Protein gene product 9.5*), NSE (neuronenspezifische Enolase; WEILER und BENALI, 2005) und der Tyrosinkinase Rezeptor TrkC (ROSKAMS *et al.*, 1996; FERON *et al.*, 2008). Die ersten beiden markieren allerdings nicht nur die reifen, sondern zum Teil auch die unreifen Neurone.

Als nicht-neuronale Zellen innerhalb des Epithels sind die Stützzellen zu finden. Diesen „weinglasförmigen“ Zellen (HEMPSTEAD und MORGAN, 1983) werden verschiedenste Funktionen zugesprochen, darunter Stützfunktion, Detoxifikation und Phagozytose abgestorbener Neurone wie von Weiler und Farbman (1998b) zusammengefasst wurde. Zur immunhistologischen Darstellung wurden in der Vergangenheit verschiedene Marker der Stützzellen, engl. *sustentacular cells*, identifiziert, hierunter der SUS-1-Marker (HEMPSTEAD und MORGAN, 1983) sowie der SUS-4-Marker (GOLDSTEIN und SCHWOB, 1996). Diese Marker sind jedoch auch in Bowmannschen Drüsen in der Lamina propria und deren Ausführungsgängen zu finden. Darüber hinaus exprimieren die Stütz- und die Drüsenzellen auch Zytokeratin 18 (SCHWOB *et al.*, 1995). Zu den Stützzellen werden noch weitere Zellen nicht-neuronalen Ursprungs gezählt, die den klassischen Stützzellen in ihrer Morphologie stark ähneln, jedoch keine Reaktivität mit dem SUS-1-Marker zeigen. Hingegen ist die Darstellung dieser Mikrovilli-tragenden Zellen dem Marker 1A-6 möglich (CARR *et al.*, 1991). Zur immunhistologischen Charakterisierung des olfaktorischen Epithels wurde in zahlreichen Studien meist Gewebe aus Ratte und Maus unterschiedlichster Altersstufen verwendet. Das Riechepithel des Menschen weist hinsichtlich der Organisation und der Zellmorphologie starke Ähnlichkeiten zum Epithel der Labornager auf (MORRISON und COSTANZO, 1992). Viele gängige immunhistologische Marker des olfaktorischen Epithels sind auch bei menschlichem Gewebe zu finden, was die Übertragung der aus Nagerstudien gewonnenen Erkenntnissen auf den Menschen erleichtert. Untersuchungen an Haus- und Nutztieren zur Charakterisierung des olfaktorischen Epithels sind hingegen nur selten in der Literatur zu

finden (DECKNER *et al.*, 1993; BOCK *et al.*, 2009; BARRIOS *et al.*, 2014b; BARRIOS *et al.*, 2014c) oder beziehen sich auf andere Komponenten des olfaktorischen Systems wie den Bulbus olfactorius oder das Vomeronasalorgan (CHOI *et al.*, 2010; SALAZAR und SANCHEZ-QUINTEIRO, 2011).

Auf speziesspezifische Unterschiede des olfaktorischen Epithels wird bei Bock *et al.* (2009) und bei Barrios *et al.* (2014c) eingegangen. Bock *et al.* (2009) konnten beim Hund, einem Translationsmodell für Rückenmarksverletzungen des Menschen, zwei histomorphologisch unterscheidbare Typen des olfaktorischen Epithels nachweisen (Abb. 2), die sich im Expressionsprofil einiger immunhistologischer Marker deutlich unterscheiden. Die in dieser Studie als Typ A und B bezeichneten Epithelabschnitte wiesen ein fleckenhaftes Verteilungsmuster innerhalb der Nase auf. Typ B konnte in den weiter rostral gelegenen Bereichen des OEs im H&E-gefärbten Schnitt (Hämatoxylin und Eosin) nachgewiesen werden, Typ A war vornehmlich in den caudalen Bereichen zu finden. Das Epithel Typ A, welches als reifes OE deklariert wurde, besitzt eine unregelmäßige luminale Oberflächen mit Endknöpfen und Zilien. Die adulten olfaktorischen Neurone im mittleren Drittel des Epithels besaßen einen großen, runden, heterochromatinreichen Nukleus mit deutlichen Nukleoli. Die weiter basal gelegen juvenilen Neurone stellten sich als kleiner und mit einem ovalen, senkrecht zur Epitheloberfläche gerichteten Nukleus dar. Letzterer Zelltyp machte einen großen Anteil der Neurone im Epithel des Typ B aus. Auffallend war hier eine ebenere Epitheloberfläche ohne erkennbare Endknöpfe und Zilien, weshalb dieser Anteil des Epithels als juvenil bezeichnet wurde. Immunhistologisch konnten im Epithel Typ A weniger proliferierende Basalzellen als in Typ B dargestellt werden. Des Weiteren konnten Unterschiede im Anteil adulter und juveniler Neurone nachgewiesen werden. So konnten im Epithel Typ B vermehrt juvenile und mit TrkB markierbare Neurone, dafür aber weniger OMP-positive adulte Neurone dargestellt werden. Die umgekehrte Situation fand sich in Epithel Typ A. Hier überwogen die OMP-positiven adulten Neurone, die meist eine positive Kernreaktion zeigten, gegenüber den mit TrkB markierten juvenilen Neuronen. Im Gegensatz dazu konnten Barrios *et al.* (BARRIOS *et al.*, 2014c) dies in dem von ihnen untersuchten Gewebe aus der Hundennase nicht nachvollziehen.

Abb. 2: Verschiedene Typen des olfaktorischen Epithel des Hundes (modifiziert nach BOCK *et al.*, 2009)



A: olfaktorisches Epithel Typ A; B: olfaktorisches Epithel Typ B; H.E.: Hämatoxylin-Eosin-Färbung; Pfeile: olfaktorische Neurone mit rundem Zellkörper und blassen, runden Zellkernen mit prominenten Nukleoli im mittleren Drittel des Epithels; Pfeilspitzen: kleinere, länglichere Neurone, senkrecht zur Epitheloberfläche angeordnet, in (A) der Basalzellschicht anliegend, in (B) auch im mittleren Drittel des Epithels zu finden

Über die Verteilung des olfaktorischen Epithels des Pferdes ist in der Literatur beschrieben, dass es sich im caudalen Bereich der Ethmoturbine in der Nähe der Siebbeinplatte befindet (KUMAR *et al.*, 2000). Zur Darstellung der proliferierenden Basalzellen wurde in einer Studie der Marker PCNA verwendet (MILLER *et al.*, 2003). In einer anderen Studie wurde das Vomeronasalorgan des Pferdes immunhistologisch untersucht (GARCIA-SUAREZ *et al.*, 1997). Der mediale Anteil des Vomeronasalorgans ist mit chemosensorischem Epithel, das der Detektion von Pheromonen dient, ausgekleidet. Dieses Epithel wurde auf das Vorhandensein der drei Typen der Tyrosinkinase-Rezeptoren untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass im chemosensorischen Epithel des Vomeronasalorgans eine als positiv für TrkA zu bewertende immunhistologische Färbung vor allem im supranukleären Bereich und am luminalen Pol der sensorischen Zellen und der Stützzellen auftrat. Gelegentlich fand sich eine immunohistochemische Reaktion unterhalb des Zellkerns. Diese Reaktion trat gleichzeitig auch im respiratorischen Epithel und im Übergangsbereich auf. Außerdem zeigten einige Mikrovilli-tragende Zellen des respiratorischen Epithels eine Anfärbung. Im Western Blot gelang der TrkA-Nachweis mit erwarteter Größe des Proteins nicht, jedoch konnten wiederholt kleinere Proteine nachgewiesen werden. Hieraus schlussfolgerte man, dass die positive Immunreaktion auf kleineren Proteinanteilen beruht, an die der gegen ein intrazytoplasmatisches Epitop nahe des C-Terminus gerichtete Antikörper bindet. Keiner der anderen Typen der Tyrosinkinase Rezeptoren konnten mittels Immunhistologie oder Western Blot nachgewiesen werden. Der *Epidermal growth factor receptor* (EGFR) konnte nur im apikalen Anteil der Epithelzellen nachgewiesen werden, jedoch nicht in den Basalzellen. Das Vorhandensein des Proteins konnte im Western Blot bestätigt werden.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war die detaillierte histologische und immunhistologische Charakterisierung des olfaktorischen Epithels des Pferdes. Das besondere Augenmerk lag dabei auf den speziesspezifischen Unterschieden im zellulären Expressionsmuster ausgewählter Zellen, da dies weitere Hinweise auf die Ursache der unterschiedlichen Empfänglichkeit einzelner Tierarten für verschiedene neurotrope Virusinfektionen, darunter die Bornasche Krankheit, liefern kann.

2.3 DIE BORNASCHE KRANKHEIT

2.3.1 Klinik

Die Bornasche Krankheit (*Borna disease*, BD) wird durch die Infektion mit dem neurotrophen *Borna disease virus* (BDV) ausgelöst. Benannt sind Krankheit und Virus nach der sächsischen Stadt Borna. Bei einem Krankheitsausbruch Ende des 19. Jahrhunderts in dieser Region erkrankten zahlreiche Pferde der Kavallerie. Die meisten von ihnen starben während eines seuchenhaften Geschehens (ZWICK, 1939). Weitere Namen, die für diese Erkrankung in der Vergangenheit verwendet wurden, sind die „Hitze Kopfkrankheit der Pferde“ (AUTHENRIETH, 1823; zitiert nach ZWICK, 1939), die „Halbakute Gehirnentzündung“ (WÖRZ, 1858; zitiert nach HEINIG, 1969) oder die „Schlafsucht der Pferde“ (WINKLER, 1883). Die heutzutage kaum noch gebräuchlichen Namen weisen darauf hin, dass das ZNS im Mittelpunkt des Krankheitsgeschehens liegt. Eine Infektion der natürlichen Haupt- bzw. Fehlwirte, Pferde und Schafe, mit dem BDV kann zu einer nicht-eitrigen Meningoenzephalomyelitis führen (ZWICK, 1939; NARAYAN *et al.*, 1983a; zusammengefasst bei RICHT und ROTT, 2001) und geht mit einer Viruspersistenz einher (MAYR und DANNER, 1974; VAHLENKAMP *et al.*, 2002). Von Herzog *et al.* (1994) wurde von einer Diskrepanz zwischen serologisch positiven und klinisch erkrankten Pferden berichtet. Während in den letzten Jahren meist nur Einzeltiererkrankungen bekannt wurden, liegt die durchschnittliche Seroprävalenz bei klinisch unauffälligen Pferden in Deutschland bei 11,5 % (HERZOG *et al.*, 1994) und steigt auf 22,5 % in Endemiegebieten bzw. auf 50 % in bereits von einer klinischen BD betroffenen Ställen an (GRABNER *et al.*, 2002). Ähnliche Erkenntnisse konnten in einer Studie über die BD bei Schafen erlangt werden. Nicht alle der seropositiven Schafe entwickelten im Beobachtungszeitraum eine klinisch manifeste Erkrankung, obwohl auch bei weiteren Tieren der Herde eine spätere Serokonversion zu verzeichnen war (METZLER *et al.*, 1979). Weitere Studien, in denen seropositive Tiere auch nach längerer Überwachungszeit keine klinische Erkrankung zeigten, haben dies bestätigt (VAHLENKAMP *et al.*, 2002; MÜLLER-DOBLIES *et al.*, 2004). Die Ursache für diese Differenz konnte noch nicht abschließend gezeigt werden. Eine entscheidende Rolle

scheinen jedoch der Immunstatus und der genetische Hintergrund der Tiere sowie das Virusisolat und die Infektionsdosis zu spielen (RICHT *et al.*, 2007; HERDEN *et al.*, 2013).

Die Inkubationszeit liegt nach einer natürlichen Infektion bei 2 bis 4 Monaten (SCHMIDT, 1912, 1952; PRIESTNALL *et al.*, 2011). In einer Studie mit experimentell infizierten Ponies traten klinische Symptome zwischen 15 und 26 Tagen nach der Infektion auf (KATZ *et al.*, 1998), jedoch wurde in dieser Studie eine intrazerebrale Infektion durchgeführt, was nicht dem natürlichen Infektionsweg entsprechen kann. Die klinischen Symptome reichen von Verhaltensauffälligkeiten über Veränderungen des Sensoriums bis hin zu Störungen der Motorik. In späten Krankheitsphasen kann es zu Lethargie, Somnolenz und Stupor kommen. Die Pferde zeigen Ataxien oder Paresen. Typisch sind auch Drangwandern, Torticollis oder das sogenannte Pfeifenrauchen, bei dem die Pferde aufgrund von Kau- und Schluckstörungen mit aus dem Maul heraushängendem Futter verharren. In ca. 90 % der Fälle kommt es innerhalb von 1 bis 4 Wochen nach Beginn der klinisch manifesten Erkrankung zum Tod (SCHMIDT, 1912, 1952; HEINIG, 1969; LUDWIG *et al.*, 1985; GRABNER und FISCHER, 1991; DÜRRWALD und LUDWIG, 1997; RICHT *et al.*, 2007; HERDEN *et al.*, 2013). In weniger ausgeprägten Fällen wurde auch über eine, zumindest temporäre, Genesung berichtet, obwohl eine persistierende Infektion des Gehirns nachgewiesen werden konnte (RICHT *et al.*, 2007).

2.3.2 Die natürliche Infektion des Pferdes

Histopathologisch ist die natürliche BDV-Infektion durch eine nicht-eitrige Meningoenzephalomyelitis mit reaktiver Astrogliose gekennzeichnet, wobei die graue Substanz am stärksten betroffen ist (ZWICK, 1939; HEINIG, 1969; RICHT *et al.*, 2007; HERDEN *et al.*, 2013). Diese Veränderungen sind am häufigsten im Bereich des limbischen Systems anzutreffen, was als Ursache für die Verhaltensänderungen gesehen wird (ROTT und BECHT, 1995; HORNIG *et al.*, 2001). Pathognomonisch, wenn auch heutzutage selten sichtbar, sind die Joest-Degenschen Einschlusskörperchen, die insbesondere in Neuronen des Ammonshorns zu finden sein können, dort aber auch in Astrozyten vorkommen (JOEST und DEGEN, 1909, 1911). Makroskopisch lässt sich lediglich in der chronischen Verlaufsform die Ausbildung eines *Hydrocephalus internus* feststellen (ZWICK, 1939; HEINIG, 1969). Dies konnte auch bei experimentell infizierten Ponies gesehen werden (KATZ *et al.*, 1998).

Die Entzündungszellpopulation von natürlich infizierten Tieren ist mit derer von experimentell infizierten Ratten zu vergleichen und auch eine vermehrte Expression von MHCI- und MHCII-Antigenen kann beobachtet werden, was auf eine ähnliche Pathogenese hindeutet (BILZER *et al.*, 1995; CAPLAZI und EHRENSPERGER, 1998). Während die CD8+ Zellen

hauptsächlich in den perivaskulären Infiltraten zu finden sind, können CD8+ Zellen meist verteilt im Parenchym gesehen werden (BILZER *et al.*, 1995).

2.3.3 Epidemiologie

2.3.3.1 Wirtsspektrum von Bornaviren

Neben Pferden und Schafen, die als End- bzw. Fehlwirt der Bornaschen Krankheit gelten, sind auch zahlreiche andere Tierarten für eine Infektion mit dem BDV empfänglich. So liegen zahlreiche Berichte über Erkrankungen bei anderen Equiden oder bei Neuweltkameliden (ALTMANN *et al.*, 1976; DÜRRWALD, 1993; LEBELT und HAGENAU, 1996; JACOBSEN *et al.*, 2010) sowie bei Rindern und Ziegen vor (IHLENBURG, 1962; DÜRRWALD, 1993; BODE *et al.*, 1994; CAPLAZI *et al.*, 1994). Zum Teil beruhen Studien, die von der Empfänglichkeit anderer Tierspezies berichten, ausschließlich auf dem serologischen Nachweis von Antikörpern im Blut von klinisch gesunden Tieren (WATANABE *et al.*, 2006). Nach wie vor wird die *staggering disease* der Katze mit einer BDV-Infektion oder einem BDV-ähnlichen Virus in Zusammenhang gebracht, jedoch wird dies von verschiedenen Autoren als nicht bewiesen angesehen (LUNDGREN *et al.*, 1995; NOWOTNY und WEISSENBOCK, 1995; KAMHIEH und FLOWER, 2006; WENSMAN *et al.*, 2013). Die erste Fallbeschreibung der BD in einem frei lebenden Luchs erfolgte im Jahr 2000 (DEGIORGIS *et al.*, 2000). Auch die in zahlreichen Studien experimentell infizierten Kaninchen können spontan an der BD erkranken (OTTA und JENTZSCH, 1960; METZLER *et al.*, 1978). Eine Seltenheit stellt hingegen die Beschreibung einer klinisch manifesten sowie histologisch und molekularbiologisch abgesicherten BD des Hundes dar (WEISSENBOCK *et al.*, 1998).

In 2008 wurde von zwei Arbeitsgruppen unabhängig voneinander ein Zusammenhang zwischen der neuropathischen Drüsenmagenerweiterung (*proventricular dilatation disease*, PDD) und neu entdeckten Aviären Bornaviren (ABV) aufgedeckt (HONKAVUORI *et al.*, 2008; KISTLER *et al.*, 2008). Diese letale Erkrankung tritt gehäuft bei Papageienvögeln, seltener auch bei anderen Vogelfamilien, auf und ist durch eine nicht-eitrige Entzündung des autonomen Nervensystems des oberen Verdauungstrakts der Vögel gekennzeichnet. Der damit einhergehende Funktionsverlust führt zur Maldigestion und zur Abmagerung sowie zur charakteristischen Dilatation des Drüsenmagens (WEISSENBOCK *et al.*, 2009a; LIERZ *et al.*, 2010; STAEHEL *et al.*, 2010). Darüber hinaus fanden sich weitere aviäre Bornaviren bei Gänse- und Sperlingsvögeln (WEISSENBOCK *et al.*, 2009b; DELNATTE *et al.*, 2011; RUBBENSTROTH *et al.*, 2013; RUBBENSTROTH *et al.*, 2014).

Neuerdings wurden Bornavirus-Sequenzen in der Afrikanischen Sumpfbandnatter (STENGLEIN *et al.*, 2014) gefunden und über die Existenz eines weiteren, reptilen

Bornavirus (RBV), dessen partielle Sequenzen in der Gabunviper gefunden wurden, wird derzeit noch spekuliert (HORIE *et al.*, 2010; FUJINO *et al.*, 2012; KUHN *et al.*, 2015).

Anfang 2015 wurde von einem weiteren, unbekanntem Bornavirus bei Bunthörnchen berichtet, das für drei Todesfälle von Bunthörnchenzüchtern verantwortlich gemacht wird. Bislang ist noch unklar, ob es sich dabei um Einzelfälle handelt. Diese neu entdeckten Bornaviren (VSBV-1, *Variogated squirrel 1 bornavirus*) weist eine Homologie von teils weniger als 70 % im Vergleich zum klassischen Säugetier-BDV (siehe 2.3.5) auf (HOFFMANN *et al.*, 2015).

Ferner wurde gezeigt, dass Teile des BDV-Genoms, namentlich Segmente des Nukleoproteins, des Matrixproteins sowie der viralen Polymerase, im Genom einiger Tierarten und des Menschen integriert sind, was vorher nur für Retroviren gezeigt werden konnte (BELYI *et al.*, 2010; HORIE *et al.*, 2010; FUJINO *et al.*, 2012). Inwieweit diese endogenen Sequenzen die Infektion mit BDV, ABV, RBV oder VSBV-1 beeinflussen, bleibt noch zu klären. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass diese Sequenzen zum Teil als mRNA transkribiert werden und dass beim Dreizehnstreifen-Hörnchen *in vitro* Proteine exprimiert werden können, die eine Interaktion mit dem RNP (Ribonukleoprotein) des BDV ermöglichen, was in einer Inhibition der BDV-Infektion resultieren könnte (FUJINO *et al.*, 2014).

2.3.3.2 Verbreitung der klassischen Bornaschen Krankheit

Die Erkrankungsfälle treten meist in den Endemiegebieten Deutschlands auf. Dazu zählen Regionen in Sachsen, Sachsen-Anhalt, Thüringen, Baden-Württemberg, Bayern und Hessen (ZWICK, 1939; HEINIG, 1969). Daneben gelten Regionen in der Schweiz und Liechtenstein (METZLER *et al.*, 1976) sowie in Österreich (SUCHY *et al.*, 1997; WEISSENBÖCK *et al.*, 1998) als endemisch. Sporadisch können jedoch auch Fälle in Regionen auftreten, die nicht zu den typischen Endemiegebieten gehören (LANGE *et al.*, 1987; HERZOG *et al.*, 1994; MÜLLER-DOBLIES *et al.*, 2004). Ferner sind auch BDV-Fälle von aus Endemiegebieten importierten Tieren, beispielsweise nach Großbritannien, nicht außer Acht zu lassen (JACOBSEN *et al.*, 2010; PRIESTNALL *et al.*, 2011).

Darüber hinaus wird immer häufiger berichtet, dass Bornaviren viel weiter verbreitet sein sollen als ursprünglich vermutet. So wird das Vorhandensein von Bornaviren in Ländern wie Island (BJORNSDOTTIR *et al.*, 2013), Finnland (KINNUNEN *et al.*, 2007), Schweden (BERG *et al.*, 1999) Japan (TANIYAMA *et al.*, 2001; HAGIWARA *et al.*, 2002; WATANABE *et al.*, 2006), Frankreich (GALABRU *et al.*, 2000), Israel, Polen, Russland, Luxemburg (HERZOG *et al.*, 1994), der Türkei (YILMAZ *et al.*, 2002), den USA (KAO *et al.*, 1993), China (ZHANG *et al.*, 2014), sowie Australien (KAMHIEH *et al.*, 2008) diskutiert, wobei Bornaviren im letzteren

Fälle nicht endemisch in Pferden zu sein scheinen (KAMHIEH *et al.*, 2006). Viele dieser Untersuchungen stützen sich jedoch ausschließlich auf den Nachweis von BDV-Serumantikörpern gesunder Tiere. Da die verwendeten Labormethoden oft nicht miteinander vergleichbar sind und deutlich in ihrer Sensitivität und Spezifität variieren, sollten die Ergebnisse genauso kritisch hinterfragt werden, wie die in den Untersuchungen zu Bornavirus-Infektionen des Menschen. Hier konnte gezeigt werden, dass es sich bei der nachgewiesenen viralen RNA um Laborstämme des BDVs handelt, bzw. konnte auch gezeigt werden, dass ein verwendeter Sandwich-ELISA mit rekombinanten Proteinen falsch positive Ergebnisse lieferte (WOLFF *et al.*, 2006; DÜRRWALD *et al.*, 2007). Daneben konnten die verschiedenen Genotypen der aviären Bornaviren aus Vögeln in aller Welt isoliert werden (HONKAVUORI *et al.*, 2008; KISTLER *et al.*, 2008; WEISSENBÖCK *et al.*, 2009a; DELNATTE *et al.*, 2011; RUBBENSTROTH *et al.*, 2014), während Sequenzen des Loveridge's garter snake virus 1 in Tansania entdeckt wurden (STENGLEIN *et al.*, 2014).

2.3.3.3 Bornavirus-Infektion des Menschen

Neben dem Vorkommen in zahlreichen Tierarten wird auch die Infektion des Menschen nach wie vor diskutiert, was die Forschergruppen in zwei Lager spaltet (GONZALEZ-DUNIA *et al.*, 1997b; RICHT *et al.*, 1997b; LIEB und STAEHELI, 2001; HERDEN *et al.*, 2013). Erste Anhaltspunkte ergaben sich in den Studien von Rott *et al.* (1985) in denen im Serum von Patienten mit episodisch auftretenden affektiven Störungen Antikörper gegen das BDV nachgewiesen werden konnten. Dies war im Serum klinisch unauffälliger Personen nicht der Fall. Zahlreiche Studien aus Deutschland, den USA und Japan folgten, die den Zusammenhang zwischen einer BDV-Infektion des Menschen und psychischen Störungen wie der manischen Depression aber auch Schizophrenie und dem *Chronic fatigue syndrome* sahen und in denen psychiatrische Patienten signifikant mehr Antikörper gegen das BDV aufwiesen als gesunde Probanden (AMSTERDAM *et al.*, 1985; BECHTER *et al.*, 1987; BODE *et al.*, 1992; FU *et al.*, 1993; RICHT *et al.*, 1993b; WALTRIP *et al.*, 1995; SAUDER *et al.*, 1996; TERAYAMA *et al.*, 2003). Viele dieser Studien stützen den Nachweis einer BDV-Infektion, wie auch viele der Untersuchungen in Tieren, allein auf die Detektion von Antikörpern in Blut oder Liquor cerebrospinalis mittels indirektem Immunfluoreszenz-Assay (IFA). In anderen Studien wurde ein ELISA zum Nachweis von zirkulierenden Immunkomplexen und Antikörpern, nicht jedoch von Antigenen durchgeführt. Dies kann die unterschiedlichen Prävalenzen zwischen den verschiedenen Studien erklären, da die Nachweismethoden oft nicht miteinander vergleichbar sind (STAEHELI *et al.*, 2000; Übersicht bei HERDEN *et al.*, 2013). Zudem konnte gezeigt werden, dass es bei einem vielfach verwendeten Sandwich-ELISA zu unspezifischen Reaktionen des Assays kam

(WOLFF *et al.*, 2006). In multizentrischen Ringversuchen ergaben sich darüber hinaus erhebliche Diskrepanzen zwischen den diagnostischen Laboratorien, was die Aussagekraft und Verlässlichkeit der serologischen Studie anzweifeln lässt (NÜBLING *et al.*, 1999). Auffallend war auch, dass die reaktiven Antikörper in den Patientenseren hauptsächlich gegen das Phosphoprotein des BDV gerichtet waren, während die Antikörper aus Tierseren meist gegen das Nukleoprotein gerichtet waren (ALLMANG *et al.*, 2001). Trotzdem gilt die Spezifität der humanen Seren für das BDV inzwischen als gesichert (BILLICH *et al.*, 2002; SCHWEMMLE und BILLICH, 2004). Ähnliche Diskrepanzen wurden beim Nachweis viraler RNA aus Zellen des strömenden Blutes, aus dem Liquor cerebrospinalis und aus Gehirnmaterial aufgedeckt. Während der Nachweis in einigen Laboren gelang (BODE *et al.*, 1995; SAUDER *et al.*, 1996; PLANZ *et al.*, 1999; ZHANG *et al.*, 2013), konnten andere Forschergruppen dies nicht nachvollziehen (RICHT *et al.*, 1997a; HORNIG *et al.*, 2012). Auffällig war bei allen Untersuchungen, die hohe Homologie zwischen den beim Menschen nachgewiesenen Stämmen und den ursprünglich isolierten Stämmen aus den Endemiegebieten (SCHWEMMLE *et al.*, 1999; STAEHELI *et al.*, 2000; STAEHELI, 2002). Es konnte letztendlich gezeigt werden, dass die publizierten viralen Sequenzen beim Menschen identisch oder nahezu identisch mit den Sequenzen der weltweit in den Laboratorien verwendeten Virusisolate waren, was auf eine Laborkontamination hinweist (DÜRRWALD *et al.*, 2007).

In neueren Veröffentlichungen wurde berichtet, dass Sequenzen des BDV in das Genom von Säugetieren und auch in das menschliche Genom integriert sind. Über eine Ursache dieser Integration oder über eine Funktion kann jedoch weiterhin nur spekuliert werden (BELYI *et al.*, 2010; HORIE *et al.*, 2010; FUJINO *et al.*, 2012). *In vitro* konnte allerdings dargelegt werden, dass die endogenen Sequenzen des Dreizehnstreifen-Hörnchens, jedoch nicht die des Menschen, mit dem RNP (Ribonukleoprotein) und damit mit der viralen Polymerase interagieren können, was zu einer Inhibition der BDV-Infektion in dieser Spezies führen könnte (FUJINO *et al.*, 2014). Kürzlich wurde darüber hinaus von drei Todesfällen bei Bunthörnchenzüchtern berichtet, die auf ein bis dato unbekanntes Bornavirus, das VSBV-1 (*Variiegated squirrel 1 bornavirus*), zurückzuführen waren, das von diesen Tieren übertragen wurde (HOFFMANN *et al.*, 2015).

2.3.3.4 Reservoir von Bornaviren

Schon früh wurden Nagetiere aufgrund jahreszeitlicher Schwankungen in der Erkrankungsrate der Hauptwirte als mögliche Reservoir für das BDV in Betracht gezogen (VAHLENKAMP *et al.*, 2002; DÜRRWALD *et al.*, 2006; KINNUNEN *et al.*, 2007), was durch die nachgewiesene Übertragbarkeit des Virus zwischen Labornagern gestützt wurde

(MORALES *et al.*, 1988; SAUDER und STAEHELI, 2003). Weitere Hinweise auf ein natürliches Reservoir ergaben sich durch Analysen epidemiologischer Parameter in den Endemiegebieten (DÜRRWALD *et al.*, 2006). So konnte gezeigt werden, dass regional unterschiedliche Virus-Cluster für die jeweiligen Endemiegebiete typisch sind (KOLODZIEJEK *et al.*, 2005). Erste Hinweise auf Spitzmäuse als mögliches natürliches Reservoir erhielten Hilbe *et al.* (2006), die eine BDV-Infektion in Feldspitzmäusen (*Crocidura leucodon*), welche zu den Insektenfressern gehören, in einem Endemiegebiet in der Schweiz nachwies (HILBE *et al.*, 2006). Diese Beobachtungen konnten auch in anderen Endemiegebieten wie Bayern und Sachsen bestätigt werden, wenn auch nicht alle Feldspitzmäuse infiziert waren (BOURG *et al.*, 2013; DÜRRWALD *et al.*, 2014). Während der Nachweis viraler RNA nur in *Crocidura leucodon gelang*, konnten auch in Spitzmäusen anderer Gattungen und in anderen Mäusen BDV-spezifische Serumantikörper nachgewiesen werden (PUORGER *et al.*, 2010; BOURG *et al.*, 2013; DÜRRWALD *et al.*, 2014). Durch Sequenzvergleiche der Virusisolate von Feldspitzmäusen mit natürlichen Fällen von BD bei Pferden aus den Endemiegebieten, sowohl in der Schweiz als auch in Deutschland, konnte eine Homologie von bis zu 100 % festgestellt werden. Dies untermauert die Vermutung, dass das Virus von den Feldspitzmäusen auf die Pferde übertragen wird (PUORGER *et al.*, 2010; BOURG *et al.*, 2013). Darüber hinaus wurde in natürlich infizierten Spitzmäusen infektiöses Virus in Speichel, Tränenflüssigkeit, Kot und Urin sowie in Abstrichen der Haut, bei gleichzeitigem Fehlen von klinischen Symptomen, gefunden. Dies ist vergleichbar mit der Situation bei neonatal infizierten Ratten, die aufgrund der Immuntoleranz persistent infiziert sind und ebenfalls große Mengen an infektiösem Virus ausscheiden. Somit stellen die infizierten Spitzmäuse vermutlich die Ansteckungsquelle für die Haupt- bzw. Fehlwirte der BD dar (NOBACH *et al.*, 2015).

2.3.4 Tiermodelle zur Untersuchung von Bornavirus-Infektionen

Die experimentelle Infektion mit dem klassischen Säugetier-Bornavirus wurde bei einer Vielzahl von Spezies durchgeführt. Erste Infektionen gelangen bei Kaninchen und Meerschweinchen (ZWICK und SEIFRIED, 1925; ZWICK, 1939). Hierbei wurde suspensiertes Gehirnmateriale von natürlich infizierten Tieren intrazerebral in die Versuchstiere verimpft. Die Tiere zeigten nach variabler Inkubationszeit neurologische Symptome, die denen der BD bei Pferden glichen, womit die Kochschen Postulate erfüllt wurden. Auch histologisch zeigten sich die typische nicht-eitrige Meningoenzephalitis und die typischen Joest-Degenschen Einschlusskörperchen. Neben kleinen Pflanzenfressern wurden jedoch auch die Hauptwirte der BD, Schafe sowie Ponies und Pferde experimentell infiziert (ZWICK *et al.*, 1926; KATZ *et al.*, 1998). Als weitere empfängliche Tierart erwiesen sich

Spitzhörnchen, bei denen ein gestörtes Sozialverhalten als dominierendes Symptom auftrat (SPRANKEL *et al.*, 1978). Daneben konnte auch bei Rhesusaffen in einem Teil der Fälle neurologische Störungen durch eine intrazerebrale Infektion hervorgerufen werden und auch Versuche an Hühnern erwiesen sich als erfolgreich (HERZOG und FRESE, persönliche Mitteilung; ZWICK *et al.*, 1926). Zur experimentellen Untersuchung von aviären Bornaviren wurden Nymphensittiche erfolgreich verwendet (PIEPENBRING *et al.*, 2012). Die heutzutage am meisten verwendeten Versuchstiere, Ratte und Maus, wurden schon früh in Infektionsversuchen auf ihre Empfänglichkeit untersucht (ZWICK *et al.*, 1926; ERNST und HAHN, 1927). Hierbei stellte sich heraus, dass nicht alle Tierstämme, insbesondere nicht alle Mausstämme, gleichermaßen infizierbar sind (ZWICK *et al.*, 1926; ERNST und HAHN, 1927; NARAYAN *et al.*, 1983a; RUBIN *et al.*, 1993; HALLENSLEBEN *et al.*, 1998). So galten adulte Mäuse lange Zeit aufgrund fehlender klinischer Symptomatik und Enzephalitis trotz hohen Virustitern im ZNS als Modell nur als bedingt geeignet (KAO *et al.*, 1984; RUBIN *et al.*, 1993). Erst durch mehrere Passagen in der Maus (RUBIN *et al.*, 1993) oder durch eine Infektion von neonatalen Mäusen konnte eine vom Mausstamm abhängige, starke klinische Erkrankung hervorgerufen werden (HALLENSLEBEN *et al.*, 1998). Bei der Verwendung von Ratten sind ebenfalls Alter, Infektionsweg und nicht zuletzt der gewählte Rattenstamm bzw. die genetische Suszeptibilität ausschlaggebend für den Verlauf der Erkrankung. Herzog *et al.* (1991) zeigten, dass schwarze Haubenratten, im Gegensatz zu Lewis- und Wistar-Ratten, keine Enzephalitis und keine klinischen Symptome nach experimenteller Infektion entwickeln. Trotzdem konnte eine persistierende Infektion mit Virusvermehrung im ZNS nachgewiesen werden. Grundsätzlich wird berichtet, dass eine intrazerebrale (ZWICK *et al.*, 1926), intranasale, intraokuläre, subkutane, intraperitoneale und intramuskuläre Infektion der Ratten möglich ist (HEINIG, 1969). Die intrazerebrale und die intranasale Infektion werden als sehr effektiv beschrieben, wohingegen die subkutane oder intraperitoneale Infektion weniger effizient verlief und die intravenöse Verabreichung des Virus nicht in einer Infektion resultierte (NARAYAN *et al.*, 1983b; CARBONE *et al.*, 1987). Letzteres ist jedoch in experimentellen Infektionen mit ABV möglich (PIEPENBRING *et al.*, 2012).

2.3.4.1 Die intrazerebrale Infektion neonataler Ratten

Die Infektion von Lewis-Ratten am ersten Lebenstag resultiert nicht in klinischen Symptomen. Es kommt jedoch zur einer Viruspersistenz mit disseminierter Virusausbreitung in periphere Organe und Bildung von spezifischen Serumantikörpern (NARAYAN *et al.*, 1983a, b), weshalb diese Ratten auch als *persistent, tolerant infection-newborn (PTI-NB) rats* bezeichnet werden (CARBONE *et al.*, 1991). Dies ist auf die Immuntoleranz zurückzuführen. Bei immunkompetenten Tieren verläuft die Infektion strikt neurotrop (HERZOG *et al.*, 1984;

MORALES *et al.*, 1988). Weiterhin wurde bei PTI-NB rats über eine Ausscheidung von infektiösem Virus in Speichel, Urin und Tränenflüssigkeit berichtet, was eine potentielle Ansteckungsquelle für Artgenossen darstellt (MORALES *et al.*, 1988; SAUDER und STAEHELI, 2003). Auch wenn die *PTI-NB*-Ratten nicht an einer klinisch manifesten BD erkranken, so konnte doch in zahlreichen Studien gezeigt werden, dass Unterschiede in der Entwicklung von Gehirn und Körper, Störungen beim Lernen sowie abnorme Verhaltensweisen auftreten. Diese Alterationen können allerdings häufig nur unter experimentellen Bedingungen und beim genauen Vergleich mit Kontrolltieren während des Versuchs aufgezeigt werden (BAUTISTA *et al.*, 1994; BAUTISTA *et al.*, 1995; PLETNIKOV *et al.*, 1999a; PLETNIKOV *et al.*, 1999b; RUBIN *et al.*, 1999; DIETZ und PLETNIKOV, 2003; DIETZ *et al.*, 2004; LANCASTER *et al.*, 2007). Auch Wochen und Monate nach intrazerebraler Infektion fanden sich keine typischen entzündlichen Veränderungen (HIRANO *et al.*, 1983; NARAYAN *et al.*, 1983a, b) trotz transienter Zytokinaufregulierungen (SAUDER *et al.*, 2000). Allerdings ließ sich histologisch in verschiedenen Studien eine Reduktion der Körnerzellen, der Purkinjezellen oder der Pyramidenzellen nachweisen, was auf Apoptosen zurückzuführen war. Betroffen waren hierbei Kleinhirn, Gyrus dentatus und der *Neocortex* (BAUTISTA *et al.*, 1995; EISENMAN *et al.*, 1999; HORNIG *et al.*, 1999; WEISSENBOCK *et al.*, 2000). Das Kleinhirn der neonatal infizierten Tiere war messbar kleiner und wies eine ausgedünnte und irreguläre Schichtung der internen und externen Granularzellschicht und der Molekularzellschicht im Vergleich zu den Kontrolltieren auf. Außerdem wurde ein Verlust der Neurone des Gyrus dentatus des Hippocampus und des Cortex cerebri gefunden werden (CARBONE *et al.*, 1991; BAUTISTA *et al.*, 1995; HORNIG *et al.*, 1999; RUBIN *et al.*, 1999; GONZALEZ-DUNIA *et al.*, 2000).

2.3.4.2 Die intrazerebrale Infektion adulter Ratten

Nach intrazerebraler Infektion immunkompetenter Lewis-Ratten im Alter von 4 bis 5 Wochen konnten in verschiedenen Studien erste klinische Symptome nach 14 bis 20 Tagen beobachtet werden (ERNST und HAHN, 1927; NARAYAN *et al.*, 1983a, b; HERDEN *et al.*, 2000; HERDEN *et al.*, 2005; WERNER-KEIŠŠ *et al.*, 2008). Die BD ist bei diesen Tieren typischerweise durch einen biphasischen Krankheitsverlauf gekennzeichnet. In der ersten Phase überwiegen Aggressivität, Hypersensitivität, Desorientierung und Störungen der Koordination. Daneben waren häufig gesteigerter Appetit und bei männlichen Tieren Priapismus zu verzeichnen. Die zweite Phase, welche zwischen dem 60. und 75. Tag nach der Infektion beginnt, ist durch Inaktivität der Ratten gekennzeichnet, die sich bis hin zur Apathie und Somnolenz steigern kann. Nach ca. 100 Tagen *post infection* kommt es in vielen Fällen zur Erblindung der Tiere (NARAYAN *et al.*, 1983a, b). Daneben entwickelten einige

Tiere in der zweiten, chronischen Phase eine Obesitas. Andere Tiere magerten im Gegensatz dazu trotz guter Futteraufnahme ab (NARAYAN *et al.*, 1983a). Je nach verwendetem Virusstamm kann das Obesitas-Syndrom allerdings auch ohne vorherige neurologische Auffälligkeiten entstehen (HERDEN *et al.*, 2000). Darüber hinaus wurden auch lediglich Störungen der Motorik, die spastische Paresen sowie Paralysen umfassen und mit einer Muskelatrophie einher gehen können, beschrieben (BIESENBACH *et al.*, 1990).

Nach intrazerebraler Infektion war infektiöses BDV hauptsächlich im Gehirn und der Retina nachweisbar. Im Rückenmark hingegen waren meist geringere Titer des infektiösen Virus zu finden (NARAYAN *et al.*, 1983a). Bereits 7 Tage nach der Infektion (*days post infection*, dpi) gelang der Nachweis von infektiösem Virus und viralem Antigen in weiten Arealen des ZNS, darunter Bulbus olfactorius, frontaler und parietaler Cortex, Septum, präformer Cortex bzw. Amygdala, Hippocampus, Thalamus, Mesencephalon, Medulla oblongata und Cerebellum (HERDEN *et al.*, 2000). Histologisch dominierte korrespondierend eine nicht-eitrige Meningoenzephalitis und Retinitis. Abhängig von der Viruspassage erreichen die Veränderungen ihr Maximum meist ca. 30 bis 40 Tage nach der Infektion (NARAYAN *et al.*, 1983a, b; HERDEN *et al.*, 2000; HERDEN *et al.*, 2005; WERNER-KEIŠŠ *et al.*, 2008). Eine Ausnahme von diesem Verteilungsmuster konnte jedoch nach intrazerebraler Infektion mit einem Virusstamm beobachtet werden, der nicht den klassischen biphasischen Infektionsverlauf, sondern Obesitas verursacht, beobachtet werden. Hier waren die entzündlichen Läsionen und der Antigennachweis auf Septum, Hippocampus, Hypothalamus und Amygdala beschränkt und auch die Virustiter waren dabei niedriger (HERDEN *et al.*, 2000). Neben den Entzündungszellinfiltraten konnte auch Neuronophagie beobachtet werden, vor allem in der inneren und äußeren Körnerzellschicht der Retina, im Cortex cerebri, hier besonders im Bereich des frontalen und temporalen Cortex sowie in den Pyramidenzellen des Hippocampus bzw. des Gyrus dentatus. Makroskopisch äußerte sich der Untergang der Neurone mit resultierendem Substanzverlust in einem *Hydrocephalus ex vacuo* (NARAYAN *et al.*, 1983a, b; HERDEN *et al.*, 2000). Als Reaktion auf die entzündlichen Veränderungen des Gehirns kommt es regelmäßig es zu einer Mikroglia- und Astrozytenaktivierung (HERDEN *et al.*, 2000; HERDEN *et al.*, 2005). MHC-I-Antigen fand sich auf den Entzündungszellen und auch auf Neuronen und Astrozyten. MHC II-Expression war immunhistologisch im Zeitraum zwischen 10 und 70 Tagen nach der Infektion in lymphozytären Zellen, Makrophagen, Mikroglia und Ependymzellen nachweisbar (DESCHL *et al.*, 1990; RICHT *et al.*, 1990). Die Entzündungszellinfiltrate bestehen aus CD4+ und CD8+ T-Zellen sowie Makrophagen, zu späteren Zeitpunkten nach der Infektion sind vermehrt auch B-Lymphozyten und Plasmazellen zu finden, wobei CD4+ Zellen und Makrophagen die dominierende Zellpopulation darstellen sollen (DESCHL *et al.*, 1990).

Allerdings kann auch eine nicht unerhebliche Anzahl von CD8+ Zellen nachgewiesen werden (STITZ *et al.*, 1991a; STITZ *et al.*, 1992).

Werden statt Lewis-Ratten athymische Nacktratten (HERZOG *et al.*, 1984; HERZOG *et al.*, 1985) oder Ratten, bei denen das Immunsystem iatrogen unterdrückt wurde (STITZ *et al.*, 1989; STITZ *et al.*, 1991b; MORIMOTO *et al.*, 1996), intrazerebral infiziert, kommt es nicht zu einer klinisch manifesten BD. Gleichzeitig können hohe Titer von infektiösem Virus im ZNS gefunden werden. Dies ist mit der persistierenden Infektion von neonatal infizierten Lewis-Ratten vergleichbar und unterstreicht, dass bei der Ausbildung der verschiedenen neurologischen Störungen und den typischen entzündlichen Veränderungen immunpathologische Mechanismen, die einer Hypersensibilitätsreaktion vom Typ IV entsprechen, die Hauptrolle spielen (RICHT *et al.*, 1989; RICHT *et al.*, 1994; RICHT und ROTT, 2001; STITZ *et al.*, 2002; RICHT *et al.*, 2007; HERDEN *et al.*, 2013). Hierbei sind die T-Zellen von besonderer Bedeutung, was durch die Verwendung von athymischen Nacktratten, die keine reifen T-Zellen besitzen und keine BD entwickelten (HERZOG *et al.*, 1985) sowie durch den adoptiven Transfer von Milzzellen aus akut infizierten, immuninkompetenten Ratten auf nichtinfizierte immuninkompetente Ratten, die daraufhin an der BD erkrankten (STITZ *et al.*, 1989), bewiesen werden konnte. Auch die Übertragung einer BDV-spezifischen CD4+ T-Zelllinie führt in immuninkompetenten aber BDV-infizierten Ratten zu den typischen klinischen Symptomen und den entzündlichen Veränderungen des ZNS. Werden diese Zellen vor der Infektion gegeben, kommt es zur Viruselimination (RICHT *et al.*, 1994). Daraus wurde geschlossen, dass die CD4+ Zellen zu einem frühen Zeitpunkt protektiv wirken, zu späteren Zeitpunkten, wenn bereits viele Zellen infiziert sind, am immunpathologischen Mechanismus beteiligt sind (RICHT *et al.*, 1994; NOSKE *et al.*, 1998). Welcher Mechanismus dabei zugrunde liegt, ist noch nicht abschließend geklärt (NOSKE *et al.*, 1998). Nicht nur die CD4+ Zellen, sondern auch die CD8+ Zellen, haben eine entscheidende Rolle bei der Immunpathogenese der BD inne (STITZ *et al.*, 1992; RICHT *et al.*, 1994; PLANZ *et al.*, 1995; STITZ *et al.*, 2002). Dies wurde durch die frühzeitige Gabe von monoklonalen Antikörpern gegen CD4+ und CD8+ Zellen bewiesen, was die Reduktion oder das Ausbleiben von entzündlichen Läsionen im ZNS zur Folge hatte und im Falle der Antikörper gegen CD8+ Zellen besonders effektiv war (STITZ *et al.*, 1992). *In vitro* wirken CD8+ Zellen, die aus Gehirnen infizierter Ratten und Mäuse gewonnen werden, zytolytisch auf infizierte Zellen, sodass postuliert wird, dass sie die Haupteffektorzellen darstellen. *In vivo* kommt es jedoch nicht zur Lyse infizierter Neurone (PLANZ *et al.*, 1993; HAUSMANN *et al.*, 1999; SCHAMEL *et al.*, 2001). Allerdings wird die Rolle der CD8+ Zellen *in vivo* dadurch unterstrichen, dass bei einer Depletion dieser Zellen die Ausprägung der BD und der histologischen Veränderungen verzögert wird (STITZ *et al.*, 1992; STITZ *et al.*, 2002).

Bereits in der akuten Phase der experimentellen BDV-Infektion von Ratten wurde von Antikörpern gegen das Nukleoprotein und das Phosphoprotein berichtet, allerdings sind diese Antikörper nicht neutralisierend (BRIESE *et al.*, 1995; FURRER *et al.*, 2001). Neutralisierende Antikörper sollen, wenn überhaupt, erst in der späten, chronischen Phase der Infektion auftreten (HATALSKI *et al.*, 1995; HATALSKI *et al.*, 1998b; RICHT und ROTT, 2001). Trotz neutralisierender Eigenschaften sind diese Antikörper nicht in der Lage die persistierende Infektion zu beenden. Durch die passive Immunisierung von immuninkompetenten Ratten mit diesen Antikörpern konnte jedoch die Virusausbreitung auf neuronales Gewebe beschränkt werden (STITZ *et al.*, 1998).

In den späten Phasen der BDV-Infektion wurde eine Abnahme der entzündlichen Läsionen im ZNS bei bestehender Viruspersistenz beobachtet (NARAYAN *et al.*, 1983a, b; DESCHL *et al.*, 1990; HERDEN *et al.*, 2000). Dies wird auf einen Wechsel von der Th1- zu einer Th2-Immunantwort zurückgeführt, was gleichzeitig den Wechsel von der akuten zur chronischen Phase darstellt (HATALSKI *et al.*, 1998a). Während in der akuten Phase eine Aufregulierung der mRNA der proinflammatorischen Zytokine TNF, IL-1 α , IL-6 und IFN γ zu detektieren ist (SHANKAR *et al.*, 1992; STITZ *et al.*, 1995; HATALSKI *et al.*, 1998a), soll in der chronischen Phase, die durch NK-Zellen, B-Zellen und aktivierte Mikroglia charakterisiert ist, IL-4 überwiegen (STITZ *et al.*, 1995; HATALSKI *et al.*, 1998a).

2.3.4.3 Die intranasale Infektion adulter Ratten

Nach einer intranasalen Infektion von 4 - 5 Wochen alten Ratten kommt es, je nach Studie, zwischen 18 und 21 Tagen bzw. 24 Tagen zu den ersten klinischen Symptomen (CARBONE *et al.*, 1987; MORALES *et al.*, 1988). Diese äußern sich durch Inkoordination, Apathie, reduzierter Futteraufnahme und Abmagerung. In einer Studie starben 90 % der infizierten Tiere innerhalb einer Woche nach dem Auftreten der Symptome (MORALES *et al.*, 1988). Shankar *et al.* (1992) berichten, dass ein Teil der intranasal infizierten Ratte 26 Tage nach der Infektion deutlich schwerwiegendere Symptome in Form von Krämpfen und Tremor zeigte als andere Tiere zu späteren Untersuchungszeitpunkten (SHANKAR *et al.*, 1992).

Infektiöses Virus konnte nach intranasaler Infektion bereits 6 dpi aus der Nasenschleimhaut und dem Bulbus olfactorius isoliert werden. Im Verlauf der Infektion konnte BDV aus einer steigenden Zahl von Regionen des ZNS isoliert werden, sodass 26 dpi alle von Morales *et al.* untersuchten Regionen, darunter Lobus frontalis, Hippocampus, Rückenmark, Trigeminalganglien und Retina, infektiöses Virus beinhalten (MORALES *et al.*, 1988). Der Antigennachweis gelang in dieser Studie ebenfalls 6 dpi und es wurde eine Ausbreitung über die olfaktorischen Leitungsbahnen in das gesamte Gehirn, das Rückenmark und die Retina beobachtet (MORALES *et al.*, 1988).

Histopathologisch fand sich erstmals 18 Tage nach der intranasalen Infektion eine geringgradige nicht-eitrige Meningoenzephalitis, die nach 27 Tagen p.i. ihr Maximum erreichte. Sie war vergleichbar mit der entzündlichen Reaktion in adult intrazerebral infizierten Ratten, wenn auch schwächer ausgeprägt (NARAYAN *et al.*, 1983b; MORALES *et al.*, 1988). Im Gegensatz zu den intrazerebral infizierten Tieren konnten hier Ödeme und Malazien gefunden werden. Lokalisiert waren diese Läsionen in der inneren Körnerschicht des Bulbus olfactorius, im vorderen olfaktorischen Kern, im präpiriformen und entorhinalen Cortex, in der Amygdala und im Tuberculum olfactorium sowie in den inneren Schichten des frontalen Cortex, im *Diencephalon* und, weniger ausgeprägt, im Mittelhirn, in der Medulla oblongata und im Kleinhirn (MORALES *et al.*, 1988).

2.3.4.4 Die intrazerebrale Infektion von Mäusen

Adult infizierte Mäuse weisen hohe BDV-Titer im Gehirn auf, entwickeln aber weder eine ausgeprägte Enzephalitis noch eine klinisch apparente BD (KAO *et al.*, 1984; RUBIN *et al.*, 1993). Erst durch die Infektion neonataler Mäuse oder durch zahlreiche Passagen in Mäusen, die adaptive Mutationen in der viralen Polymerase zur Folge haben, konnten neurologische Symptome erzielt werden (RUBIN *et al.*, 1993; HALLENSLEBEN *et al.*, 1998; ACKERMANN *et al.*, 2007). Virale RNA war regelmäßig erst 20 dpi nachzuweisen und erreichte ca. 4 Wochen nach der Infektion das Maximum (HALLENSLEBEN *et al.*, 1998). Vier bis sechs Wochen nach der intrazerebralen Infektion der Neonaten traten die ersten neurologischen Störungen wie Kopfschiefhaltung sowie abnorme Haltung der Hintergliedmaßen und zu späteren Zeitpunkten auch eine Paraparese auf. Es waren jedoch auch Symptome wie gestäubtes Fell, Kümern und Gewichtsabnahme zu beobachten (HALLENSLEBEN *et al.*, 1998). Obwohl bei verschiedenen Mausstämmen eine vergleichbare Virusausbreitung im Gehirn nachvollzogen werden konnte, waren Unterschiede in Inzidenz und Schwere der Erkrankung auffällig (RUBIN *et al.*, 1993; HALLENSLEBEN *et al.*, 1998). Histologisch war eine nicht-eitrige Meningoenzephalitis, vor allem im Cortex cerebri und im Ammonshorn, weniger im Kleinhirn und im Thalamus, zu finden (HALLENSLEBEN *et al.*, 1998; FREUDE *et al.*, 2002). Wie auch bei der Ratte verursacht nicht das Virus selbst, sondern ein immunpathologischer Mechanismus die Erkrankung. Dieser Mechanismus beruht auf der Erkennung eines spezifischen T-Zellepitops (TELEISSI) des BDV-N durch infiltrierende zytotoxische CD8⁺ Zellen in Mäusen, wie beispielsweise MRL-Mäuse, die das MHC H-2^K Allel tragen (HALLENSLEBEN *et al.*, 1998; HAUSMANN *et al.*, 1999; SCHAMEL *et al.*, 2001). Werden MRL-Mäuse mit dem BDV infiziert, sind im ZNS sowohl CD4⁺ Zellen als auch CD8⁺ Zellen zu finden. Letztere zeigen eine AntigenSpezifität für BDV-N (HAUSMANN *et al.*, 1999; SCHAMEL *et al.*, 2001). Durch

die Verwendung von CD8+ T-Zell-defizienten Mäusen konnte die wichtige Rolle dieses Zelltyps für die Ausbildung von klinischen Symptomen herausgestellt werden (HALLENSLEBEN *et al.*, 1998; HAUSMANN *et al.*, 2005). Durch eine herunterregulierte funktionale Aktivität der BDV-N-spezifischen CD8+ Zellen soll in persistent infizierten Tieren die Entzündungsreaktion beeinflusst und die Viruspersistenz begünstigt werden (ENGELHARDT *et al.*, 2005). Die Überexpression von Zytokinen wie IL-12 und TNF kann in weniger empfänglichen Mäusen zur Ausprägung klinischer Symptome führen, darunter epileptiforme Krämpfe im Falle einer Überexpression von TNF (FREUDE *et al.*, 2002; KRAMER *et al.*, 2012). Der Effekt von IL-12 soll dabei über IFN γ -sezernierende Lymphozyten vermittelt sein (HOFER *et al.*, 2004). IFN γ wird dabei auch ein neuroprotektiver Effekt zugesprochen (HAUSMANN *et al.*, 2005).

2.3.5 Bornaviren

Bereits zu Beginn des letzten Jahrhunderts vermuteten Joest und Degen erstmals ein Virus als ätiologisches Agens der Bornaschen Krankheit (JOEST und DEGEN, 1909, 1911). Die nach ihnen benannten Joest-Degenschen Einschlusskörperchen vom Typ Cowdry B sind bei vielen der an der BD erkrankten Tiere intranukleär in Neuronen und Astrozyten zu finden. Durch die intrazerebrale Infektion von Kaninchen mit steril filtrierter Gehirnemulsion eines Pferdes mit natürlicher BDV-Infektion konnte die Virusätiologie von Zwick *et al.* (1925) erstmalig bestätigt werden. Bis zur Entdeckung eines verwandten Virus in Papageienvögeln 2008 (HONKAVUORI *et al.*, 2008; KISTLER *et al.*, 2008), galt das BDV als einziger Vertreter der Familie der *Bornaviridae* in der Ordnung *Mononegavirales*. Es folgten die Differenzierung der aviären Bornaviren in bislang 14 Genotypen (KISTLER *et al.*, 2008), Nachweise in anderen Vogelarten (WEISSENBÖCK *et al.*, 2009b; DELNATTE *et al.*, 2011; RUBBENSTROTH *et al.*, 2013; RUBBENSTROTH *et al.*, 2014) sowie in Reptilien (FUJINO *et al.*, 2012; STENGLEIN *et al.*, 2014). Ende 2014 wurde ein Vorschlag zur taxonomischen Reorganisation der Familie *Bornaviridae* publiziert (KUHNS *et al.*, 2015). Die Familie der *Bornaviridae* soll in drei Genera (*Bornavirus*, nicht zugeordnete Bornaviren und vorläufige, unklassifizierte Bornaviren) unterteilt werden. Zum Genus *Bornavirus* sollen dabei fünf Spezies gezählt werden: das *Mammalian 1 bornavirus*, das *Psittaciform 1 bornavirus*, das *Passeriform 1 bornavirus*, das *Waterbird 1 bornavirus* sowie das *Passeriform 2 bornavirus*. Es wurde weiterhin vorgeschlagen das *Mammalian 1 bornavirus* in das Borna disease virus 1 (BoDV-1), was dem früheren, „klassischen“ BDV entspricht und dem Borna disease virus 2 (BoDV-2), das dem Isolat No/98 entspricht, unterteilt werden. Das *Psittaciform 1 bornavirus* wird unterteilt in 5 Viren: parrot bornavirus 1 bis 4 und 7 (PaBV-1 bis -4, -7). Das *Passeriform 1 bornavirus* umfasst das canary bornavirus 1 bis 3 (CnBV-1 bis -3) sowie das munia

bornavirus 1 (MuBV-1). Mit dem aquatic bird bornavirus 1 (ABBV-1) ist nur ein Virus innerhalb der Spezies *Waterbird 1 bornavirus* aufgelistet und auch der Spezies *Passeriform 2 bornavirus* gehört bislang nur ein Virus, das estrildid finch bornavirus 1 (EsBV-1) an. Innerhalb des Genus der nicht zugeordneten Bornaviren existiert bisher nur eine Spezies, das *Elapid 1 bornavirus*, mit nur einem Virus, dem Loveridge's garter snake virus 1 (LGSV-1). Im Genus der vorläufig unklassifizierten Bornaviren sind bis dato keine Spezies festgelegt worden. Das Genus umfasst fünf Viren, darunter das avian bornavirus MALL (ABV-MALL), das Gaboon viper virus 1 (GaVV-1), sowie das parrot bornavirus 5 und 6 (PaBV-5, -6). Kürzlich wurde auch ein weiteres Virus aus Bunthörnchen isoliert, das eine Homologie von teils weniger als 70 % zu dem klassischen Säugetier-BoDV-1 aufweist und als *Variiegated squirrel 1 bornavirus* (SVBV-1) bezeichnet wurde (HOFFMANN *et al.*, 2015).

2.3.5.1 Virusaufbau und Genomorganisation

Für alle bisher entdeckten Bornaviren wird ein vergleichbarer Genomaufbau angenommen. Detaillierte Studien existieren nur für das klassische Säugetier BDV-1.

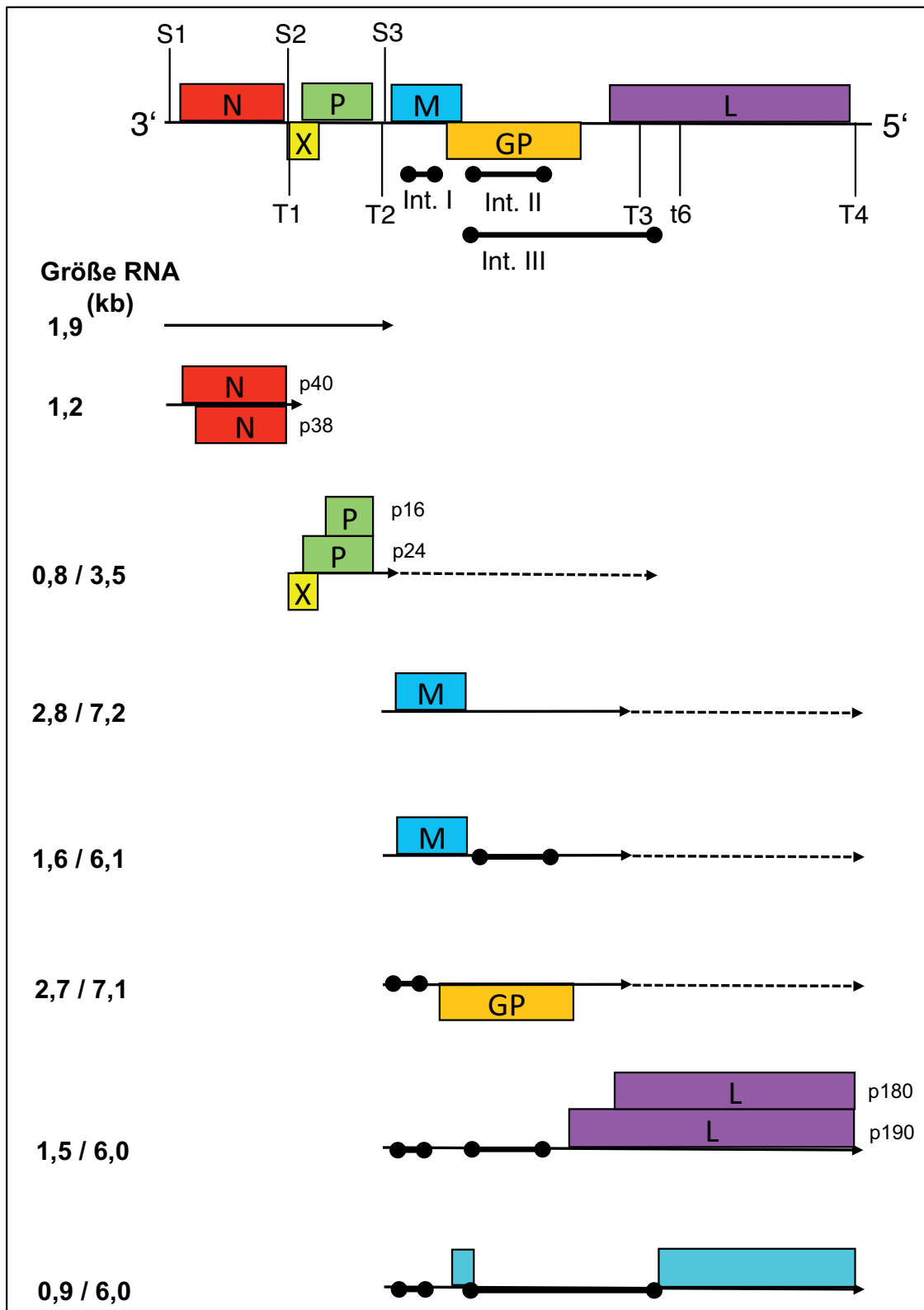
Das BDV besitzt ein einzelsträngiges, lineares und negativ orientiertes Genom (BRIESE *et al.*, 1994; CUBITT und DE LA TORRE, 1994; CUBITT *et al.*, 1994b). Eine Besonderheit des BDV ist, dass Replikation und Transkription im Zellkern stattfinden (BRIESE *et al.*, 1992; CUBITT und DE LA TORRE, 1994; CUBITT *et al.*, 1994a; CUBITT *et al.*, 1994b). Elektronenmikroskopisch stellen sich *in vitro* die Viruspartikel als kugelartige Gebilde mit einem Durchmesser von 80 bis 100 nm dar. Innerhalb dieser Partikel ist ein elektronendichter Kern mit einem Durchmesser von 50 bis 60 nm und ein helikal gewundenes Nukleokapsid von ca. 4 nm erkennbar. Auf der Oberfläche lässt sich eine Hüllmembran darstellen, die mit ca. 7 nm langen Fortsätzen besetzt ist, welche den *spikes* anderer Viren ähneln (RICHT *et al.*, 1993a; ZIMMERMANN *et al.*, 1994; GONZALEZ-DUNIA *et al.*, 1997a; KOHNO *et al.*, 1999; KIERMAYER, 2002). Für Viren, die dem ABV zugerechnet werden, konnten Partikel vergleichbarer Größe auch in infizierten Tieren detektiert werden (HOPPES *et al.*, 2010; WUNSCHMANN *et al.*, 2011).

Die Länge des Genoms mit 8,9 kb ist im Vergleich zu anderen Vertretern der Ordnung *Mononegavirales* sehr kurz, jedoch ähnelt der Aufbau des Genoms mit den Nukleoprotein am 3'-Ende und der RNA-Polymerase am 5'-Ende stark anderen Vertretern dieser Ordnung (BRIESE *et al.*, 1994; CUBITT und DE LA TORRE, 1994; Übersicht bei DE LA TORRE, 1994). Der Aufbau des BDV-Genoms ist schematisch in Abb. 3 dargestellt. Im Gegensatz zu anderen negativsträngigen RNA-Viren fehlen intergenische Regionen, stattdessen überlappen die 6 offene Leseraster bzw. *open reading frames* (ORFs) zum Teil (Übersicht bei HERDEN *et al.*, 2013) und codieren für drei Transkriptionseinheiten (I-III). In der

Orientierung 3' bis 5' ist zuerst das Nukleoprotein (BDV-N) in der einzigen monocistronischen Transkriptionseinheit I zu finden, das den ersten offenen Leserahmen inne hat (ORF I) und vom Startsignal S1 und dem Stoppsignal T1 flankiert ist. Es folgt die bicistronische Transkriptionseinheit II, die von den Signalen S2 und T2 flankiert wird, mit dem BDV-X-Protein (BDV-X), das sich im ORF x1 und dem Phosphoprotein (BDV-P), das sich im ORF II befindet. Weiter in 5'-Richtung schließen sich in der Transkriptionseinheit III, die von S3 und T3 begrenzt wird, das Matrixprotein BDV-M im ORF III und das Glykoprotein BDV-GP im ORF IV an, wobei ORFs III und IV überlappen. Am 5'-Ende ist die RNA-abhängige RNA-Polymerase BDV-L des ORF V zu finden, deren genetische Information bei dem Terminationssignal T4 endet (BRIESE *et al.*, 1994; DE LA TORRE, 1994; SCHNEEMANN *et al.*, 1995). Als weitere Besonderheit sind das Überlesen von Transkriptionsterminationssignalen sowie das alternative Spleißen beschrieben (SCHNEEMANN *et al.*, 1994; SCHNEIDER *et al.*, 1994; SCHNEEMANN *et al.*, 1995; TOMONAGA *et al.*, 2000; DE LA TORRE, 2002; TOMONAGA *et al.*, 2002). Zur Synthese viraler bzw. genomischer RNA (vRNA bzw. gRNA) wird eine vollständige antigenomische, positiv orientierte (+ss) RNA als Matrize verwendet. Beide RNAs sind nicht polyadenyliert, besitzen keine Kappe am 5'-Ende zum Schutz vor Exonukleasen und kommen gleichzeitig in infizierten Zellen und als infektiöse Ribonukleoproteine (RNPs) vor (BRIESE *et al.*, 1994; CUBITT *et al.*, 1994a; Übersicht bei DE LA TORRE, 1994).

Auffallend ist, dass das Genom des BDV, das bei Säugetieren zu finden ist, stark konserviert ist (BINZ *et al.*, 1994; HERZOG *et al.*, 1997; KOLODZIEJEK *et al.*, 2005; DÜRRWALD *et al.*, 2006). So lagen in 40 untersuchten Labor-, Feld- und Impfstämmen lediglich Sequenzunterschiede bis zu 4 % vor, was eine Einteilung in 5 genetische Cluster zuließ, die verschiedenen Endemiegebieten zuzuordnen waren. Eine Ausnahme konnte nur bei dem Virus No/98, das bis zu 16 % Sequenzunterschied aufwies, ausgemacht werden (KOLODZIEJEK *et al.*, 2005; zusammengefasst bei DÜRRWALD *et al.*, 2006). Im Gegensatz dazu hat sich gezeigt, dass die neu entdeckten Bornaviren deutlich mehr Divergenz aufweisen und heterogener sind, wobei die Homologie teils nur etwa 60 % beträgt (HOFFMANN *et al.*, 2015; KUHN *et al.*, 2015).

Abb. 3: Schematische Darstellung des BDV-Genoms und der Transkripte (nach POROMBKA, 2006; HERDEN, 2009; ICTV, 2012; HERDEN *et al.*, 2013)



Die viralen Proteine sind als farbige Rechtecke dargestellt. Die Positionen der Startsignale sind als S (S1-S3) und die der Stoppsignale als T (T1-T4, t6) markiert. Die Lokalisationen der Introns (Int. I-III) sind durch dicke Linien mit Punkten an den Enden dargestellt. Gestrichelte Linien indizieren ein mögliches Überlesen an T2 und T3. N: Nukleoprotein; P: Phosphoprotein; X: X-Protein; M: Matrixprotein; G: Glykoprotein; L: Polymerase; kb: Kilobasen.

2.3.5.2 Die Proteine des BDV

Wie bei anderen Vertretern der negativsträngigen RNA-Viren (NSS-RNA-Viren), wenn auch weniger stark ausgeprägt, lässt sich ein Transkriptionsgradient in der 3' zu 5' Richtung erkennen. Folglich lassen sich auch die viralen Proteine in unterschiedlichen Mengen nachweisen. Das BDV-Nukleoprotein und das Phosphoprotein nehmen dabei mengenmäßig den größten Anteil ein, wobei BDV-N in der akuten Phase deutlich überwiegt, was für eine starke Replikation sorgt, und BDV-P in der Phase der Viruspersistenz aufgrund gesteigerter Expression dominiert (PYPER und GARTNER, 1997; WATANABE *et al.*, 2000; SCHNEIDER *et al.*, 2003; SCHNEIDER, 2005). Zusammen mit der viralen RNA, bilden BDV-L, -N und -P den viralen Polymerasekomplex, der auch als Ribonukleoproteinkomplex (RNP) bezeichnet wird und die kleinste infektiöse Einheit darstellt (CUBITT *et al.*, 1994a; CONZELMANN, 1998, 2004). Dies konnte auch in einem *minireplicon assay* nachgewiesen werden (PEREZ *et al.*, 2003; SCHNEIDER *et al.*, 2003; DE LA TORRE, 2006). Die Interaktion von BDV-P mit BDV-X hat zum einen einen negativen Einfluss auf die Aktivität des RNPs (WOLFF *et al.*, 2000; YANAI *et al.*, 2006), zum anderen kann BDV-X auch das *assembly* des RNP unterstützen (POENISCH *et al.*, 2008a). Das BDV-GP hingegen konnte *in vivo* und *in vitro* nur bei ca. 1-10 % der infizierten Zellen gefunden werden (RICHT *et al.*, 1998; DE LA TORRE, 2002; WERNER-KEIŠS *et al.*, 2008).

Proteine des viralen Polymerasekomplexes

Das Nukleoprotein

Das Nukleoprotein (BDV-N) stellt einen essentiellen Bestandteil des Nukleokapsids dar und kommt beim BDV der Säugetiere in zwei Isoformen vor. Diese besitzen ein Molekulargewicht von 38 (p38) bzw. 39/40 (p40) kDa. Auch wenn beide Formen im Zellkern vorkommen können, ist p40 hauptsächlich im Kern und p38 im Zytoplasma von infizierten Zellen zu finden (PYPER und GARTNER, 1997; HERDEN *et al.*, 2013). Ein weiterer Unterschied dieser beiden Formen ist, dass das *nuclear localisation signal* (NLS) nur am N-terminus der 39/40 kDa-Form zu finden ist, das NES (*nuclear export signal*) kommt dagegen bei beiden Formen vor (PYPER *et al.*, 1997; KOBAYASHI *et al.*, 1998). Das NES überlappt dabei mit der BDV-P-bindenden Region und umfasst gleichzeitig die TELEISSI-Region, die dem T-Zellepitop für zytotoxische CD8+ T-Zellen von Mäusen entspricht (KOBAYASHI *et al.*, 2001; TOMONAGA *et al.*, 2002). Am Beispiel infizierter Ratten konnte gezeigt werden, dass das Nukleoprotein *in vivo* sowohl in Neuronen als auch in Astrozyten, Oligodendrozyten und Ependymzellen vorkommt. Dort ist es im Nukleus, im Perikaryon und auch im Neuropil zu finden (MORALES *et al.*, 1988; HERDEN *et al.*, 2000; HERDEN *et al.*, 2005; WERNER-KEIŠS *et al.*, 2008). Genomische RNA, die für das BDV-N codiert, ließ sich zu frühen

Zeitpunkten p.i. (*post infection*) zunächst als punktförmiges, nukleäres Signal ansprechen, das dem Nukleolus entsprechen soll. Im weiteren Verlauf weitete sich das Signal zu einer diffusen Anfärbung des Kerns aus und ab etwa 24 dpi (*days post infection*) konnte die genomische RNA auch im Zytoplasma gefunden werden (WERNER-KEIŠŠ *et al.*, 2008). Positiv orientierte BDV-N-RNA (+ss RNA), die auch die mRNA umfasst, war generell meist im Zytoplasma und in neuronalen Fortsätzen zu finden, jedoch waren in 50 - 80 % der Zellen auch positive Zellkerne zu verzeichnen. Wie auch bei der genomischen RNA war zu Beginn der Infektion meist zunächst ein punktförmiges Signal und später ein diffuses Signal im Kern zu detektieren (WERNER-KEIŠŠ, 2006; HERDEN, 2009). *In vitro* wurden p38 und p40 nur im Zellkern nachgewiesen (PYPER und GARTNER, 1997; KOBAYASHI *et al.*, 1998).

Das Phosphoprotein

Das BDV-P (Phosphoprotein) ist ein 24 kDa schweres Protein (THIERER *et al.*, 1992). In anderen NNS-RNA-Viren fungiert es als ein Co-Faktor und Regulator der viralen Polymerase (BANERJEE *et al.*, 1991; HORIKAMI *et al.*, 1992; TOMONAGA *et al.*, 2002). Dies wird auch für das BDV-P angenommen. Es soll am Zusammenbau des RNPs, speziell der Enkapsidierung, beteiligt sein und interagiert mit BDV-N und BDV-X (SCHWEMMLE *et al.*, 1998; WOLFF *et al.*, 2000; SCHNEIDER *et al.*, 2004; SCHNEIDER, 2005). Wie auch das BDV-N kommt es in zwei Isoformen vor, wobei die zweite Variante, p16, 16 kDa schwer ist und ihre Funktion noch nicht genau bekannt ist. Der Nachweis war sowohl *in vivo* als auch *in vitro* vor allem im Nukleus aber auch im Zytoplasma möglich (SCHNEEMANN *et al.*, 1995; SCHWEMMLE *et al.*, 1998; SHOYA *et al.*, 1998; KOBAYASHI *et al.*, 2000; TOMONAGA *et al.*, 2002; KOBAYASHI *et al.*, 2003). Im Rattenmodell ist BDV-P in allen Zelltypen des Gehirns im Nukleus, im Zytoplasma, in Zellfortsätzen und im Neuropil nachweisbar (HERDEN, 1997). Wie auch das BDV-N besitzt das Protein p24 zwei NLS (SHOYA *et al.*, 1998), dem p16 Protein fehlt dieses Signal am N-Terminus.

Das BDV-X-Protein

Das BDV-X ist mit 10 kDa das kleinste Protein des BDV (WEHNER *et al.*, 1997; DE LA TORRE, 2002; TOMONAGA *et al.*, 2002) und interagiert indirekt mit dem BDV-N (WOLFF *et al.*, 2000). Da es sich beim BDV-X um ein Nichtstrukturprotein handelt, wird es nicht in die Viruspartikel eingebaut, sondern fungiert als negativ-regulierenden Faktor des RNPs (PEREZ *et al.*, 2003; SCHNEIDER *et al.*, 2003). Jedoch konnte in einer anderen Studie gezeigt werden, dass es den Zusammenbau des RNPs auch fördern kann und daher eher als Regulator statt als Inhibitor zu verstehen ist (POENISCH *et al.*, 2008a). In infizierten Zellen konnte das BDV-X zusammen mit BDV-P und BDV-N im Kern und im Zytoplasma nachgewiesen werden (WEHNER *et al.*, 1997; KOBAYASHI *et al.*, 2003; SCHWARDT *et al.*,

2005). *In vivo* ist es hauptsächlich im Zytoplasma von Gehirnzellen zu finden (WEHNER *et al.*, 1997; HERDEN, 1999).

Die virale RNA-abhängige RNA-Polymerase

Das 180 kDa große BDV-L hat die Funktion einer RNA-abhängigen RNA-Polymerase und interagiert mit dem Phosphoprotein, mit dem es oft in Kernen infizierter und transfizierter Zellen zu finden ist (WALKER *et al.*, 2000; SCHNEIDER *et al.*, 2004). Der Transport in den Nukleus, dem Ort der Replikation, soll über ein NLS im BDV-L vermittelt sein (WALKER und LIPKIN, 2002) oder über die Interaktion mit dem Phosphoprotein ablaufen (SCHNEIDER *et al.*, 2003). Dass BDV-L auch in den transfizierten Zellen im Nukleus zu finden ist, spricht für die erstere Hypothese (WALKER *et al.*, 2000). Auch für dieses Protein wurde die Existenz von zwei weiteren Isoformen diskutiert, deren Funktion allerdings unklar ist (DE LA TORRE, 2002). Eine Regulation der Polymerase läuft vermutlich über Phosphorylierung ab, da es in etwa 40 phosphorylierbare Stellen aufweist (WALKER *et al.*, 2000). In Gehirnen natürlich infizierter Pferde konnte positivsträngige RNA vor allem im Kern aber auch im Zytoplasma nachgewiesen werden (ALGERMISSEN *et al.*, 2007a, b). In experimentell infizierten Ratten war BDV-L mRNA ebenfalls im Zellkern und im Zytoplasma, seltener auch in Zellfortsätzen nachweisbar. Sowohl während der akuten als auch der chronischen Phase konnte sie am stärksten im Ammonshorn und schwächer im Nucleus caudatus, Thalamus und Cortex cerebri nachgewiesen werden (WENTZ, 2009), was auf eine produktive Virusreplikation vor allem im Ammonshorn hinweist.

Strukturproteine des BDV

Das Matrixprotein

Das Matrixprotein des BDV, BDV-M, das zur Virushülle gehört, besitzt ein Gewicht von 16 kDa und soll eine Funktion beim *assembly* und beim *budding* des Virus haben (KRAUS *et al.*, 2001; KRAUS *et al.*, 2005), wie es auch für andere behüllten Viren beschrieben ist (MARTIN und HELENIUS, 1991; GAROFF *et al.*, 1998). Daneben soll es die Replikation regulieren, indem es mit dem RNP interagiert. Im Gegensatz zum Tollwut-Virus, bei dem das Matrixprotein die Funktion der Polymerase negativ reguliert, wird dem BDV-M eine leicht verstärkende Funktion der Polymerase zugesprochen (CHASE *et al.*, 2007). Das Matrixprotein wurde zuerst für ein untypisch glykosyliertes Protein der Virusmembran gehalten (KLICHE *et al.*, 1994), zwischenzeitlich wurde gezeigt, dass das BDV-M ein unglykosyliertes Protein an der inneren Schicht der Virushülle ist (KRAUS *et al.*, 2001). *In vitro* kann BDV-M im Zytoplasma detektiert werden, es kommt aber auch im Zellkern vor, wo es mit BDV-P und BDV-X co-lokalisiert ist (CHASE *et al.*, 2007). In experimentell infizierten Ratten konnte BDV-M immunhistologisch im Zytoplasma von Neuronen und Astrozyten und

nur selten im Zellkern detektiert werden. Im zeitlichen Verlauf war BDV-M-Antigen im Ammonshorn, Cortex cerebri, Thalamus, Amygdala, Corpus callosum, Nucleus caudatus/Putamen, Mesencephalon, Medulla oblongata und Cerebellum zu finden. BDV-M +ssRNA war zumeist in Ammonshorn, Thalamus und Cortex cerebri zu finden. Zu späten Untersuchungszeitpunkten dominierte das Signal in Astrozyten (WERNER-KEIŠS, 2006; HERDEN, 2009).

Das Glykoprotein

Das einzige Glykoprotein des BDV (BDV-GP) bildet zusammen mit dem Matrixprotein einen Teil der Virushülle und hat eine Masse von 84 bis 94 kDa, weshalb verschiedene Kurzbezeichnungen (p84, p94) existieren (GONZALEZ-DUNIA *et al.*, 1997a; SCHNEIDER *et al.*, 1997a; RICHT *et al.*, 1998). Die verschiedenen Molekulargewichte ergeben sich durch unterschiedlich starke Glykosylierung des 57 kDa schweren Vorläuferproteins, die im endoplasmatischen Retikulum (ER) stattfindet (SCHNEIDER *et al.*, 1997a). Das BDV-GP wird posttranslational von der zelleigenen Subtilisin-ähnlichen Protease Furin in zwei Untereinheiten gespalten. Die 51 kDa große N-terminale Untereinheit wird auch als gp51 bzw. BDV-GP-N bezeichnet und ist für die initiale Rezeptorbindung wichtig, während die 43 kDa große C-terminale Untereinheit als gp43 bzw. BDV-GP-C bezeichnet wird und die pH-abhängige Fusion der Virushülle mit der Wirtsmembran vermittelt (GONZALEZ-DUNIA *et al.*, 1998; RICHT *et al.*, 1998; PEREZ *et al.*, 2001; KIERMAYER *et al.*, 2002). Die Spaltung erfolgt bereits im ER und in der dem ER zugewandten cis-Region des Golgi-Apparates, was für die biologische Aktivität notwendig ist (EICKMANN *et al.*, 2005). BDV-GP spielt somit eine wichtige Rolle während der ersten Phase der Infektion und kann so den Gewebe- und Zelltropismus bestimmen (GONZALEZ-DUNIA *et al.*, 1998; RICHT *et al.*, 1998; WERNER-KEIŠS *et al.*, 2008). Die frühere Annahme, dass ungespaltenes GP in aufgereinigten Viruspartikeln vorkommt (GONZALEZ-DUNIA *et al.*, 1997a), konnte widerlegt werden (EICKMANN *et al.*, 2005). Von den Spaltprodukten wird nur ein kleiner Anteil zur Zellmembran transportiert. Der Großteil akkumuliert im ER und im Golgi-Apparat (GONZALEZ-DUNIA *et al.*, 1997a; GONZALEZ-DUNIA *et al.*, 1998; KIERMAYER *et al.*, 2002; EICKMANN *et al.*, 2005).

2.3.5.3 Der Infektionszyklus des BDV

Adsorption und Penetration

Bislang ist noch unbekannt welchen oder welche Wirtszellrezeptoren das BDV benutzt um in die Zelle einzudringen (DUCHALA *et al.*, 1989; CLEMENTE und DE LA TORRE, 2007). Bekannt ist jedoch, dass das Virus über eine Rezeptor-vermittelte Endozytose in die Zelle

gelangt, wobei das virale Glykoprotein (GP) eine entscheidende Rolle im Hinblick auf den Gewebe- und Zelltropismus spielt (GONZALEZ-DUNIA *et al.*, 1998; RICHT *et al.*, 1998). Das 43 kDa große Fragment (gp43 bzw. GP-C) und das 56 kDa große Fragment (gp56 bzw. GP-N) sind für die Anheftung und die Rezeptor-vermittelte Endozytose verantwortlich und vermitteln die Fusionsprozesse zwischen Virus und der Zellmembran (GONZALEZ-DUNIA *et al.*, 1998; RICHT *et al.*, 1998; PEREZ *et al.*, 2001). Dies konnte mittels *In-vitro*-Untersuchungen bestätigt werden, in denen die Virusausbreitung durch die Inhibition von Furin gehemmt wurde (BAJRAMOVIC *et al.*, 2003; LENNARTZ *et al.*, 2015). Außerdem läuft der Eintritt in die Zelle über eine Clathrin-vermittelte Endozytose und Caveola-unabhängig ab. Der optimale pH-Wert für diesen Prozess liegt zwischen 6,0 und 6,2, wie er im frühen Endosom vorkommt. Weiterhin ist dieser Prozess Rab5-abhängig und Rab7-unabhängig (CLEMENTE und DE LA TORRE, 2009). Eine weitere wichtige Rolle wird in diesem Zusammenhang dem Cholesterin der Zellmembran zugesprochen (CLEMENTE *et al.*, 2009).

Transkription und Replikation

Eine Besonderheit des BDV ist, dass die Replikation und die Transkription im Zellkern stattfinden. Damit ist es das einzige Virus in der Ordnung der *Mononegavirales* mit dieser Fähigkeit (BRIESE *et al.*, 1992; CUBITT und DE LA TORRE, 1994; DE LA TORRE, 1994). Lange wurde angenommen, dass beide Prozesse im Nukleolus ablaufen (PYPER *et al.*, 1998). Inzwischen ist jedoch gezeigt worden, dass das BDV eng mit den Chromosomen der Wirtszelle assoziiert ist und das Chromatin als eine Art Gerüst benutzt um Zentren für die Virusproduktion aufzubauen. Die RNPs interagieren dabei direkt mit den Histonen und werden sogar bei der Mitose auf Tochterzellen aufgeteilt, was zur viralen Persistenz beitragen soll (MATSUMOTO *et al.*, 2012). Diese Zentren der Virusproduktion wurden darüber hinaus mit den Joest-Degenschen Einschlusskörperchen, wie sie *in vivo* vorkommen, verglichen (FUJINO *et al.*, 2014). Die Transportprozesse der RNPs zwischen Kern und Zytoplasma werden sowohl vom Nukleoprotein, wobei nur die p40 Isoform ein NLS trägt, als auch vom Phosphoprotein, das ein potentes NLS trägt und mit beiden BDV-N Isoformen interagiert, vermittelt. Sowohl p38 als auch p40 tragen darüber hinaus ein NES, das mit einer Bindungsstelle für BDV-P überlappt, und bewirken so zusammen mit dem BDV-P einen wichtigen Shuttle-Mechanismus für die RNPs innerhalb der Zelle (KOBAYASHI *et al.*, 1998; SHOYA *et al.*, 1998; KOBAYASHI *et al.*, 2001; DE LA TORRE, 2002; TOMONAGA *et al.*, 2002; HERDEN *et al.*, 2013).

Die virale RNA-abhängige RNA-Polymerase wird in diesen Prozessen genutzt, um die vollständige komplementäre RNA (cRNA) oder subgenomische RNAs zu synthetisieren (BRIESE *et al.*, 1994; CUBITT *et al.*, 1994a). Wie bei anderen NSS-RNA-Viren auch, wenn auch weniger ausgeprägt, entsteht bei der Transkription ein Gradient in der Richtung 3' zu 5'.

Das bedeutet, dass die Menge der Transkripte zum 5'-Ende hin abnimmt (DE LA TORRE, 2002; TOMONAGA *et al.*, 2002). Für andere Vertreter der *Mononegavirales* ist bekannt, dass eine bestimmte Menge an viralem Protein in der Zelle dazu führt, dass die Transkription zugunsten der Replikation herunter reguliert wird. Es wird spekuliert, dass dies auch für BDV-N und BDV-P zutrifft (TOMONAGA *et al.*, 2002). Hinsichtlich des Mengenverhältnisses von genomischer RNA, positivsträngiger BDV-N-spezifischer RNA (mRNA) und *leader-containing* RNA (leRNA), welche als antigenomischer Marker für die Replikation genutzt werden kann, wurde gezeigt, dass in experimentell infizierten Ratten stets nur wenig leRNA im Vergleich zu genomischer RNA und der deutlich überwiegenderen BDV-N-mRNA vorhanden ist. Das Verhältnis von genomischer zu leRNA nimmt von der akuten zur chronischen Phase hin zugunsten der leRNA ab, was bedeutet, dass die Replikation zurück geht. Gleichzeitig nimmt der Gehalt an mRNA in der chronischen Phase signifikant ab, was auf eine Regulation der Transkription schließen lässt. Dieser Mechanismus trägt vermutlich entscheidend zur Viruspersistenz bei (POROMBKA *et al.*, 2008a).

Zur Synthese der sechs Proteine des BDV bedarf es besonderer Replikations- und Transkriptionsstrategien, da im Gegensatz zu anderen Vertretern der Ordnung *Mononegavirales* die Transkriptionseinheiten und die Transkriptionssignale überlappen (DE LA TORRE, 2002). Dazu gehören das Überlesen von Transkriptionsterminations-Signalen und alternatives Spleißen (BRIESE *et al.*, 1992; DE LA TORRE, 1994; SCHNEEMANN *et al.*, 1994; SCHNEIDER *et al.*, 1994; SCHNEEMANN *et al.*, 1995; TOMONAGA *et al.*, 2002). Der schematische Aufbau des BDV-Genoms sowie die Transkripte sind in Abb. 3 dargestellt. Definiert sind die 3 Transkriptionseinheiten durch drei Startsignale (S1-S3), die semikonservierte uracilreiche Motive enthalten und welche bei anderen NSS-RNA-Viren nicht zu finden sind sowie vier Polyadenylierungs- bzw. Terminationssignale (T1-T4), was zur Ausbildung eines Poly(A)-Schwanzes führt (DE LA TORRE, 2002; TOMONAGA *et al.*, 2002). Ein weiteres Terminationssignal (t6) wurde beschrieben, jedoch konnte seine Relevanz bislang nur unzureichend dargelegt werden (BRIESE *et al.*, 1994; CUBITT *et al.*, 2001). Das Überlappen der Transkriptionseinheiten findet sich bereits bei Transkriptionseinheit I und II, wo das Startsignal S2 stromaufwärts vom Terminationssignal T1 liegt (BRIESE *et al.*, 1994; CUBITT *et al.*, 1994a; SCHNEEMANN *et al.*, 1994; HERDEN *et al.*, 2013). Die Translation von BDV-P und BDV-X aus der bicistronischen Transkriptionseinheit II erfolgt durch einen Überlesemechanismus, dem sogenannten *leaky scanning* (SCHNEIDER *et al.*, 1997b; WEHNER *et al.*, 1997). Darüber hinaus wurde berichtet, dass es in der Transkriptionseinheit III, welche die sich überlappenden ORFs III und IV beinhaltet, mit einer Wahrscheinlichkeit von 5 % zu einem Überlesen des Terminationssignals T3 kommt. Das Resultat ist ein verlängertes Transkript, das bei dem Terminationssignal T4 endet und den ORF V, bzw. das BDV-L, transkribiert (SCHNEIDER,

2005). Die Transkripte werden für die Expression der Proteine BDV-M, -GP und -L durch alternatives Spleißen der mRNA verändert (CUBITT *et al.*, 1994b; SCHNEEMANN *et al.*, 1994; TOMONAGA *et al.*, 2000; DE LA TORRE, 2002; TOMONAGA *et al.*, 2002; SCHNEIDER *et al.*, 2005).

Für das BDV sind 3 Introns (Intron I - III) bekannt. Das Intron I liegt im ORF III an der Position 1932-2025 Nucleotide (nt). Die Expression des BDV-M erfolgt, wenn das Transkript ab dem Startsignal S3 das Intron I enthält (CUBITT *et al.*, 1994b; SCHNEIDER *et al.*, 1994; TOMONAGA *et al.*, 2000). Intron II ist im Bereich 2410-3703 nt (Abb. 3) und somit innerhalb des ORFs IV zu finden. Die Transkripte codieren für das BDV-GP. Es konnte gezeigt werden, dass das Spleißen von Intron I die Expression des Glykoproteins verstärkt (SCHNEIDER *et al.*, 1994; SCHNEIDER *et al.*, 1997b; SCHNEIDER, 2005). BDV-L kann exprimiert werden, wenn Transkripte im Bereich des Introns II gespleißt werden, die bis zum Terminationssignal T4 gehen (SCHNEIDER, 2005). Cubitt *et al.* berichteten von einem dritten Intron (Intron III, 2410–4559 nt; Abb. 3). Die gespleißten Transkripte sollen dabei für 2 weitere Proteine mit einer Masse von 8,4 und 165 kDa codieren. Es wurde postuliert, dass das 165 kDa große Proteinfsegment eine Variante der viralen Polymerase sein soll (CUBITT *et al.*, 2001). Die genaue Funktion dieser Proteine bleibt allerdings unklar, zumal sie bislang nicht *in vivo* nachgewiesen werden konnten. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass diese Spleißstelle bei dem BDV-Isolat No/98 sowie beim ABV fehlt (PLESCHKA *et al.*, 2001; HERDEN *et al.*, 2013) und dass eine *exon splicing suppressor sequence* existiert, die die Verwendung dieser Region unterdrückt (TOMONAGA *et al.*, 2000).

Wiederholt wurde vom Vorhandensein von 1,9 kb langen Transkripten unbekannter Funktion in infizierten Zellen berichtet (BRIESE *et al.*, 1994; SCHNEEMANN *et al.*, 1994) und spekuliert, dass es sich um verkürzte Replikationsprodukte oder verlängerte Form der *leader RNA* handeln könnte (SCHNEEMANN *et al.*, 1994). In einer neueren Studie wurde allerdings gezeigt, dass durch Überlesen von T1 eine polyadenylierte und mit einer Kappe versehene RNA von ebensolcher Länge entsteht, die die ORFs von BDV-N, -X und -P enthält. Diese soll eine wichtige Rolle bei der Feinregulierung des intrazellulären Gehalts an den entsprechenden Proteinen spielen. Die bis dato nicht charakterisierte Sequenz zwischen dem N- und dem X-Gen nimmt so Einfluss auf die virale Polymerase und ihre Effizienz die Transkription bei T1 zu stoppen (POENISCH *et al.*, 2008b).

Ein wichtiger Mechanismus zur Etablierung der persistierenden und nicht-zytolytischen Infektion wird in der Verkürzung der 3'- und 5'-Enden der genomischen und antigenomischen RNA gesehen, da hierdurch die Effizienz der Replikation vermindert wird (ROSARIO *et al.*, 2005; SCHNEIDER, 2005; SCHNEIDER *et al.*, 2005). Darüber hinaus, und im Gegensatz zu der Situation bei einigen anderen NSS-RNA-Viren, löst die genomische RNA so keine Interferonantwort über eine RIG-I-Aktivierung aus. Dies ist durch das Fehlen der

Triphosphatgruppe am 5'-Ende, die posttranskriptional entfernt wird und durch ein Monophosphat ersetzt ist, zu erklären (HABJAN *et al.*, 2008).

Innerhalb der 3. Transkriptionseinheit sind zwei Instabilitätsregionen entdeckt worden, wovon eine im Bereich des Introns II zu finden ist, was einen weiteren Mechanismus zur Modifikation der Genexpression darstellt. Hierdurch kann erklärt werden, warum der beim BDV beobachtete Gradient der nachweisbaren Proteine nicht ganz dem anderer NSS-RNA-Viren entspricht (SIEMETZKI *et al.*, 2009).

Reifung und Freisetzung

Bislang konnten nur beim ABV Viruspartikel in Geweben infizierter Tiere nachgewiesen werden. Beim BDV der Säugetiere war dies nur *in vitro* in geringem Maße möglich (KIERMAYER, 2002). So konnten im Zytoplasma BDV-infizierter Zellen virusähnliche Partikel gesichtet werden, die das morphologische Korrelat zu infektiösen und zellfreien Virionen darstellen sollen (COMPANS *et al.*, 1994). Sie waren vor allem im Bereich der Zellmembran zu finden und standen nicht in Kontakt zum endoplasmatischen Retikulum oder dem Golgi-Apparat, weshalb keine Hinweise auf den Zusammenbau erlangt werden konnten. Wichtig für den Transport der RNPs zwischen Zellkern und Zytoplasma, und damit auch für die Reifung und den Zusammenbau, sind die NES und die NLS im Nukleo- und letztere auch im Phosphoprotein (PYPER und GARTNER, 1997; KOBAYASHI *et al.*, 1998; SHOYA *et al.*, 1998; TOMONAGA *et al.*, 2002). Freie Viruspartikel an der Zelloberfläche infizierter MDCK-Zellen konnten nur durch die Zugabe von n-Butyrat zur Zellkultur beobachtet werden (KOHNO *et al.*, 1999). Inwieweit dies jedoch mit der Situation *in vivo* vergleichbar ist, bleibt fraglich. Für die Reifung und Freisetzung infektiöser Viruspartikel spielen bei vielen Viren sowohl Matrix- als auch Glykoproteine eine entscheidende Rolle (MARTIN und HELENIUS, 1991; GAROFF *et al.*, 1998). Dies wird auch für das Matrixprotein des BDV angenommen (KRAUS *et al.*, 2001; KRAUS *et al.*, 2005).

2.3.5.4 Virusausbreitung in vivo und in vitro

Für das BDV ist seit langem bekannt, dass es sich in experimentell infizierten Ratten intraaxonal und transsynaptisch vom olfaktorischen System ins ZNS ausbreiten kann, wo die Ausbreitung ebenfalls transsynaptisch erfolgt (CARBONE *et al.*, 1987; MORALES *et al.*, 1988). Bislang konnte nicht gezeigt werden, dass vollständige Viruspartikel weitergegeben werden. Für das Tollwut-Virus, das ebenfalls zur Ordnung *Mononegavirales* gehört, konnte allerdings dargelegt werden, dass virale RNPs als infektiöses Agens im ZNS transportiert werden. Zudem ist sowohl *in vitro* als auch *in vivo* nur wenig bzw. kein freies Virus nachweisbar ist (GOSZTONYI *et al.*, 1993). Für eine erfolgreiche Ausbreitung zwischen

Neuronen *in vivo* soll das Vorhandensein des BDV-GP unerlässlich sein (WERNER-KEIŠS *et al.*, 2008). Obwohl bekannt ist, dass RNPs auch ohne Hülle infektiös sein können, kann eine Virusausbreitung in Kulturen hippocampaler Neurone durch neutralisierende anti-GP-Antikörper oder durch Verwendung eines Furin-Inhibitors verhindert werden. Das zeigt, dass das virale Glykoprotein für eine erfolgreiche Ausbreitung notwendig ist, auch wenn in der Kultur nur wenige infektiöse Viruspartikel nachweisbar sind (BAJRAMOVIC *et al.*, 2003). Allerdings wurde in einer anderen Studien dargelegt, dass für die Ausbreitung *in vitro* nach einer erfolgreich abgelaufenen primären Infektion weder zelluläre Rezeptoren vorhanden sein müssen, noch eine Spaltung des viralen Glykoproteins von der zelleigenen Protease Furin erfolgen muss (CLEMENTE und DE LA TORRE, 2007). Jedoch verlief die Ausbreitung wesentlich effizienter wenn Furin vorhanden war. Außerdem wurde in dieser Arbeit angenommen, dass CHO-Zellen (*chinese hamster ovary cells*) nicht mit BDV infizierbar sind, was von anderen Arbeitsgruppen widerlegt werden konnte (Eickmann, persönliche Mitteilung). Darüber hinaus wurde auch für MDCK-Zellen, Vero E6-Zellen und Astrozyten gezeigt, dass das gespaltene Glykoprotein für die Zell-zu-Zell Ausbreitung unerlässlich ist, da die Ausbreitung durch einen Furin-Inhibitor gehemmt werden konnte. In einer neuroglialen Mischkultur der Ratte konnte dies nur in Astrozyten, nicht jedoch in Neuronen nachvollzogen werden, vermutlich da die Ausbreitung zwischen den Neuronen in der Kultur mit niedrigen Inhibitor-Konzentrationen nicht gehemmt werden konnte (LENNARTZ *et al.*, 2015).

3. MATERIAL UND METHODEN

3.1 CHARAKTERISIERUNG DES OLFAKTORISCHEN EPITHELDES DES PFERDES

3.1.1 Probengewinnung und Aufbereitung der Proben

Zur Untersuchung der Lokalisation des olfaktorischen Epithels (OE) innerhalb der Pferdenase und zur immunhistologischen Charakterisierung der zellulären Komponenten wurden fünf Pferdenasen untersucht. Die Pferde stammten aus dem Sektionsgut des Instituts für Veterinär-Pathologie der Justus-Liebig-Universität Gießen. Die Altersspanne reichte von 3 bis 21 Jahren, untersucht wurden eine Stute und vier Wallache. Die Tiere litten vorberichtlich nicht an respiratorischen Erkrankungen oder zentralnervösen Störungen und auch in der pathologisch-anatomischen sowie histopathologischen Untersuchung ergaben sich keinerlei Hinweise auf oben genannte Erkrankungen (8.3.1, Tab. 19). Die Probengewinnung erfolgte spätestens 12 Stunden nach dem Tod des Tieres. Der Kopf wurde abgesetzt, vollständig enthäutet und ca. 1 cm paramedian links mit einer Bandsäge der Länge nach eröffnet. Auf diese Weise konnte sichergestellt werden, dass jeweils die rechte Nasenhälfte ohne artifizielle Schädigung des Nasenseptums untersucht werden konnte. Anschließend wurde das Präparat bis zur weiteren Aufarbeitung in Klotzscher Lösung (8.1.1) zur Fixation bei 4 °C aufbewahrt. Mit einer Diamantsäge wurden die Nasenhälften in ca. 2 cm breite Querschnitte unterteilt und die gesamte Nasenhöhle untersucht. Aus jeder Pferdenase wurden 13 Querschnitte gewonnen. Sie wurden von caudal nach rostral mit den Buchstaben A bis M bezeichnet (Abb. 4). Auf dem ersten Querschnitt A war stets der Übergang des Bulbus olfactorius zur Lamina cribrosa zu finden, während mit dem letzten Querschnitt M der Bereich um die Nasenöffnung untersucht wurde. Von jedem Querschnitt wurden immer 5 Areale aus der gleichen Lokalisation zur weiteren histologischen Untersuchung ausgewählt (Abb. 5), mit der Diamantsäge heraus gesägt und für die Einbettung an die Größe der Einbettkapsel angepasst. So wurde immer Gewebe der Lamina perpendicularis, die rostral in die Nasenscheidewand übergeht (Lokalisation 1), drei Lokalisationen der Nasenmuscheln, unterteilt in einen dorsalen, einen mittleren und einen ventralen Bereich (Lokalisationen 2, 3 und 4), sowie Gewebe der Begrenzung der Nasenhöhle gewonnen und untersucht (Lokalisation 5). Die Entkalkung wurde mittels EDTA (8.1.1) im Wärmeschrank bei 37 °C durchgeführt. Die Lösung wurde alle zwei Tage ausgetauscht und die Inkubationszeit betrug je nach Knochenanteil und -dicke zwischen 1 und 3 Wochen. Vor dem routinemäßigen Einbetten in Paraffin mit dem Gewebereinbettungsautomat Tissue-Tek® VIP™ 5 Jr. (Sakura Finetek, Staufen) wurden die

Gewebeproben über Nacht in Leitungswasser gewässert um das gelöste Kalzium auszuwaschen.

Abb. 4: Lage der Querschnitte durch die rechte Hälfte der Pferdenase

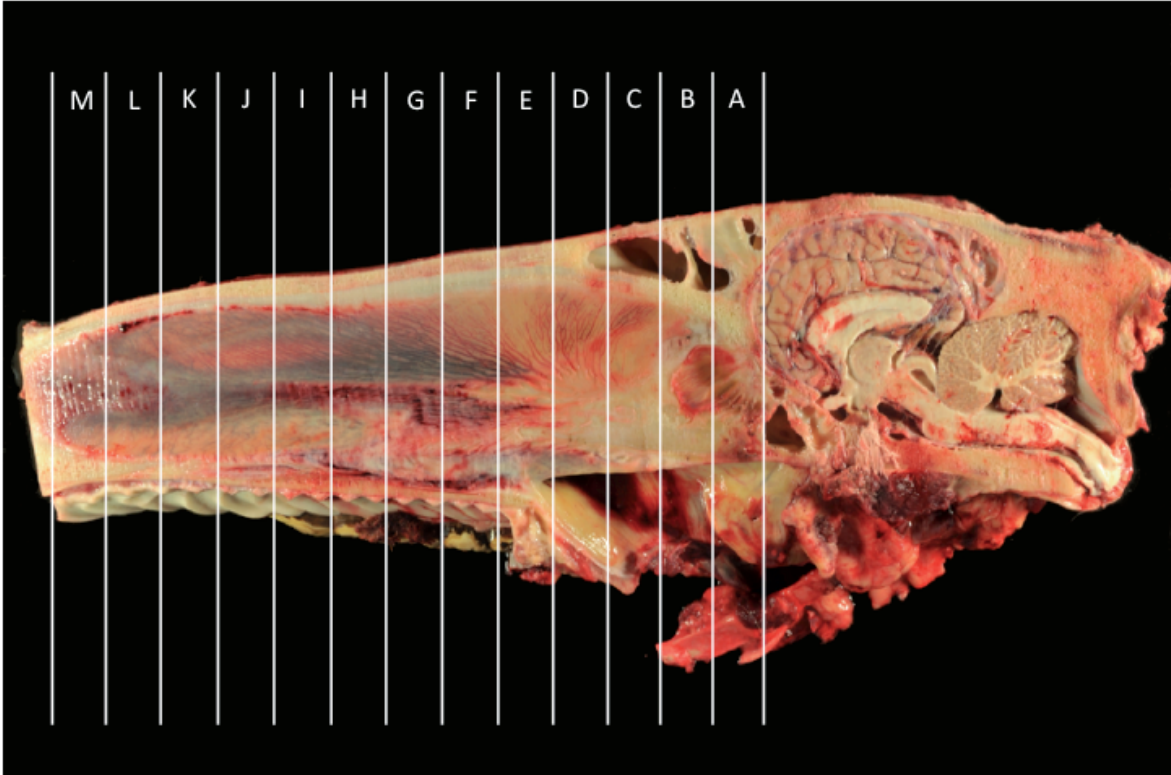
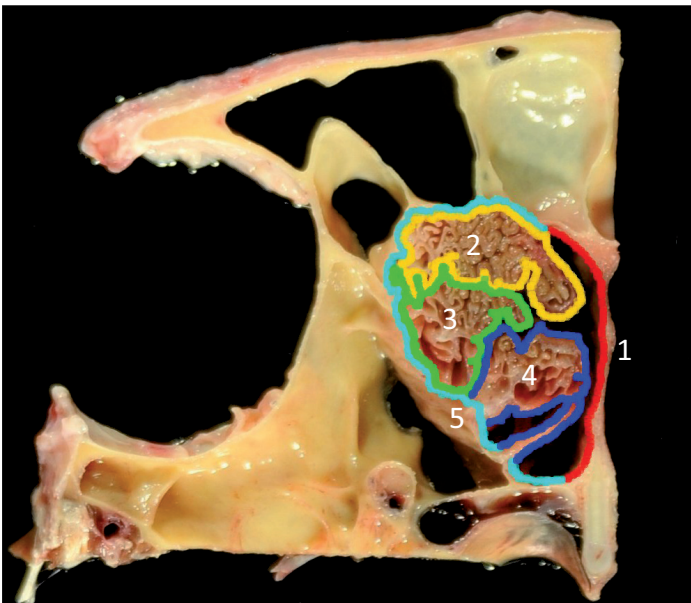


Abb. 5: Untersuchte Lokalisationen der Nasenquerschnitte



Querschnitt C; 1: Nasenseptum (rot), 2: dorsaler Bereich Nasenmuscheln (gelb), 3: mittlerer Bereich Nasenmuscheln (grün), 4: ventraler Bereich Nasenmuscheln (blau), 5: Begrenzung der Nasenhöhle (türkis)

3.1.2 Histopathologische Untersuchung

Von den in Paraffin eingebetteten Gewebeproben wurden ca. 4 µm dicke Gewebeschnitte angefertigt und auf Objektträger (Süsse Objektträger, Süssefrost Labortechnik, Gudensberg) aufgezogen. Nach der Trocknung für 30 min im Wärmeschrank wurde mittels eines Färbeautomats (Microm, HMS 740; über Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA) eine Hämatoxylin-Eosin-Färbung (H&E) durchgeführt. Die Schnitte wurden lichtmikroskopisch mit dem Nikon Eclipse 80i auf das Vorhandensein des olfaktorischen Epithels untersucht (siehe 3.1.2.1). Konnte auf dem Gewebeschnitt olfaktorisches Epithel nachgewiesen werden, so wurde die entsprechende Lokalisation immunhistologisch mit den vier unter 3.1.3.1 beschriebenen Antiseren untersucht.

3.1.2.1 Quantitative Auswertung des olfaktorischen Epithels des Pferdes

Die Gewebeschnitte wurden lichtmikroskopisch mit dem Nikon Eclipse 80i zunächst auf das Vorhandensein von Riechepithel untersucht. Dabei wurde der Gehalt des morphologisch identifizierbaren Epithels, bezogen auf das auf dem gesamten Gewebeschnitt vorhandene Epithel, durch Betrachtung mit dem 10-fach Objektiv bestimmt und in 20 %-Stufen geschätzt. So ergaben sich die folgenden möglichen Werte:

- 0 % kein olfaktorisches Epithel auf dem Gewebeschnitt vorhanden
- 20 % bis zu 20 % olfaktorisches Epithel
- 40 % bis zu 40 % olfaktorisches Epithel
- 60 % bis zu 60 % olfaktorisches Epithel
- 80 % bis zu 80 % olfaktorisches Epithel
- 100 % nur olfaktorisches Epithel auf dem Gewebeschnitt vorhanden

Zur Beantwortung der Frage, ob die Unterschiede im prozentualen Gehalt des OEs abhängig vom Querschnitt oder der Lokalisation sind bzw. ob die Unterschiede im Gehalt des OEs auf einer Wechselwirkung von Querschnitt und Lokalisation beruhen, wurde eine zweifaktorielle Varianzanalyse mit Messwiederholungen von Querschnitt und Lokalisation durchgeführt (siehe 3.1.5). Daneben wurde diese Fragestellung mittels exaktem Friedman-Test untersucht. So wurde zunächst ebenfalls geprüft, ob Wechselwirkungen zwischen Querschnitt und Lokalisation bestehen. In zwei weiteren Stufen wurden anschließend die Lokalisationen getrennt nach den Querschnitten und umgekehrt die Querschnitte getrennt nach den Lokalisationen verglichen. Diesem Verfahren wurde die α -Adjustierung nach Bonferoni-Holm zugrunde gelegt. Aufgrund der semiquantitativen Daten konnte keine

Normalverteilung vorausgesetzt werden und aufgrund des Stichprobenumfangs von 5 untersuchten Pferden erfolgte die statistische Auswertung explorativ und auf zwei verschiedenen Wegen, um die Tendenzen in den Daten statistisch abzusichern.

3.1.2.2 Untersuchung und quantitative Auswertung der Typen des olfaktorischen Epithels des Pferdes

Bei der histologischen Auswertung der Nasenquerschnitte A bis M mit den jeweils fünf untersuchten Lokalisationen wurde in besonderem Maße auf das Vorhandensein verschiedener Untertypen des Epithels, wie sie bei Bock *et al.* (2009) beschrieben sind, geachtet. Da sich bei der Auswertung morphologische Unterschiede ergaben, die Ähnlichkeiten mit den bereits von Bock *et al.* beschriebenen Typen aufwiesen, wurde auch in der vorliegenden Arbeit zwischen zwei Typen unterschieden. Es wurde außerdem untersucht und abgeschätzt, welchen Anteil die morphologisch unterscheidbaren Typen des Riechepithels, Typ A und Typ B, am gesamten Epithel auf dem Gewebeschnitt einnahmen. Die Summe der prozentualen Anteile der zwei Epitheltypen entsprach in dieser Auswertung dem gesamten Anteil des olfaktorischen Epithels auf dem jeweiligen Gewebeschnitt (bestimmt unter 3.1.2.1).

Auch bei der Untersuchung der verschiedenen Epitheltypen konnte aufgrund des semiquantitativen Charakters der Daten keine Normalverteilung angenommen werden. Wie bereits unter 3.1.2.1 beschrieben, erfolgte die statistische Datenanalyse daher ebenfalls explorativ und auf zwei verschiedenen Wegen.

Zur Untersuchung, ob signifikante Unterschiede in der Verteilung der Epitheltypen A und B bestanden, ob diese abhängig von den untersuchten Querschnitten oder Lokalisationen waren (zweifache Wechselwirkung) oder ob eine dreifache Wechselwirkungen zwischen Epitheltyp, Querschnitt und Lokalisation bestand, wurde eine dreifaktorielle Varianzanalyse mit Messwiederholungen von Querschnitt, Lokalisation und Typ durchgeführt (siehe 3.1.5). Darüber hinaus wurde zur Absicherung der Tendenzen in den ermittelten Daten ein exakter Friedman-Test, dem eine α -Adjustierung nach Bonferoni-Holm zugrunde gelegt wurde, durchgeführt. So wurde für die Epitheltypen A und B getrennt geprüft, ob Wechselwirkungen zwischen Querschnitt und Lokalisation bestanden. In zwei weiteren Stufen wurden anschließend, wenn Wechselwirkungen nachgewiesen wurden, die Lokalisationen getrennt nach den Querschnitten und umgekehrt die Querschnitte getrennt nach den Lokalisationen verglichen. Ebenso wurden die Querschnitte und Epitheltypen auf Wechselwirkungen untersucht. Waren diese nachweisbar, wurden die Epitheltypen getrennt nach Querschnitten und die Querschnitte getrennt nach Epitheltypen verglichen. Zuletzt wurden auf entsprechende Weise Wechselwirkungen von Epitheltyp und Lokalisation getrennt nach den

Querschnitten untersucht. Lagen Wechselwirkungen vor, so wurden die Epitheltypen getrennt nach Lokalisationen und umgekehrt die Lokalisationen getrennt nach den Epitheltypen verglichen. Wurde bei den untersuchten Komponenten keine Wechselwirkung nachgewiesen, wurde in den folgenden Schritten jeweils der arithmetischer Mittelwert der gemessenen Werte verglichen, um zumindest eine globale Aussage über die Signifikanz der beobachteten Unterschiede des Anteils des olfaktorischen Epithels zu ermöglichen.

3.1.3 Immunhistologische Untersuchung der Pferdenasen

Konnte auf den H&E-gefärbten Gewebeschnitten morphologisch olfaktorisches Epithel identifiziert werden, wurde von der entsprechenden Lokalisation die im Folgenden beschriebenen immunhistologischen Untersuchungen zur Markierung der verschiedenen Zelltypen durchgeführt. Dazu wurden die Antiseren anti-OMP, anti-DCX, anti-TrkA sowie anti-PCNA (Tab. 2) verwendet. Zusätzlich wurden an ausgewählten Gewebeproben, die morphologisch gut erkennbares OE enthielten, die Antiseren anti-NSE, anti-NeuN und anti-TH zur Darstellung der neuronalen Komponenten verwendet und auf deren prinzipielle Eignung getestet. Der Schwerpunkt der immunhistologischen Untersuchungen lag auf der Charakterisierung der neuronalen Zelltypen, sowie deren Vorläufern. Jeder immunhistologische Marker, der beim Pferd verwendet wurde, wurde ebenfalls auf Gewebeschnitten des olfaktorischen Epithels der Ratte getestet. Hierbei wurde insbesondere auf Unterschiede der angefärbten Zellen oder des Färbungsmuster innerhalb der Zelle im Vergleich zum OE des Pferdes geachtet. Etwaige Abweichungen zu den immunhistologischen Protokollen zur Untersuchung der Pferdenase sind jeweils nach dem Protokoll angeführt.

Als Kontrollen wurden bei jeder immunhistologischen Untersuchung Schnitte mitgeführt, auf denen die gesuchten Zelltypen sicher vorhanden waren. Als Negativkontrollen wurde für jeden Gewebeschnitt zusätzlich ein Schnitt mit einem Serum inkubiert, das aus derselben Spezies wie der Primäantikörper stammte oder, im Falle von Antiseren aus der Maus, aus derselben Spezies stammte und gegen T-Lymphozyten des Huhns gerichtet war (HIRSCHBERGER, 1987).

3.1.3.1 Seren und Primärantikörper

Seren

Die in der immunhistologischen Untersuchung der Pferdenasen verwendeten Seren sind in Tab. 1 aufgeführt.

Tab. 1: Verwendete Seren und ihre Bezugsquellen

Serum [Bezeichnung durch Hersteller]	Bezugsquelle
Pferdeserum [Donor Horse Serum]	PAA Laboratories GmbH, Pasching, Austria
Rattenserum [Rat Serum]	PAA Laboratories GmbH, Pasching, Austria
Schweineserum [Porcine Serum]	PAA Laboratories GmbH, Pasching, Austria
Ziegenserum [Goat Serum]	PAA Laboratories GmbH, Pasching, Austria
Kaninchenserum [Negative Control Rabbit Immunoglobulin Fraction (Solid Phase Absorbed)]	Dako A/S, Glostrup, Denmark

Primärantikörper

Die in der Immunhistologie verwendeten Primärantikörper sind in Tab. 2 aufgelistet.

Tab. 2: Übersicht über die verwendete Primärantikörper

Primärantikörper	Klonalität	Verdünnung	Blocken
Bezugsquelle	Spezifität	Vorbehandlung	Detektion
Ziege anti-Olfactory Marker Protein (OMP) Wako Chemicals USA, Inc., Richmond, VA, USA	Polyklonal Nager OMP	1:3000 in TBS + 1 % BSA Zitratpuffer (pH 6,0), 23 min	20 % PS, 20 min ABC
Ziege anti-Doublecortin (DCX (C-18)) Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA, USA	Polyklonal Epitop am C-Terminus des humanen DCX	1:250 in TBS + 1 % BSA Zitratpuffer (pH 6,0), 23 min	20 % PS + 0,3 % Triton® X-100, 60 min Streptavidin
Maus anti-Proliferating cell nuclear antigen (PCNA) Dako	Monoklonal Clone PC 10	1:100 in TBS + 1 % BSA Zitratpuffer (pH 4,0), 23 min	10 % RS, 10 min Maus PAP
Kaninchen anti-Tyrosinkinase-Rezeptor-A (TrkA (763)) Santa Cruz	Polyklonal Epitop nahe des C-Terminus des humanen TrkA	1:100 in TBS + 20 % SS keine	20 % SS, 15 min ABC
Maus anti-Neuron Specific Enolase (NSE) Invitrogen Corporation, Camarillo, CA, USA	Monoklonal Clone NSE-1G4; γ -Untereinheit der NSE (neuronaler Ursprung) des Rindes	1:100 in TBS + 1 % BSA Zitratpuffer (pH 6,0), 23 min	PS unverdünnt, 10 min ABC
Maus anti-Neuronal Nuclei (NeuN, Neuron Specific Nuclear Protein) EMD Millipore Corporation, Billerica, MA, USA	Monoklonal Clone A60; Zellkerne des Gehirns der Maus	1:100 in TBS + 1 % BSA Zitratpuffer (pH 6,0), 23 min	PS unverdünnt, 10 min ABC
Kaninchen anti-Tyrosine Hydroxylase (TH) Biotrend Chemikalien GmbH, Köln	Polyklonal Humane Tyrosinhydroxylase	1:250 in TBS + 20 % SS Zitratpuffer (pH 6,0), 23 min	SS unverdünnt, 20 min Streptavidin

TBS: *tris buffered saline*; BSA: bovines Serumalbumin; PS: Pferdeserum; RS: Rattenserum; PAP: Peroxidase anti-Peroxidase Methode; SS: Schweineserum; ABC: Avidin-Biotin-Komplex Methode

Sekundärantikörper

Die verwendeten Sekundärantikörper sind in Tab. 3 aufgeführt.

Tab. 3: Übersicht über die verwendeten Sekundärantikörper

Sekundärantikörper	Bezugsquelle	Verdünnung
Ziege anti-Kaninchen IgG (H+L), biotinyliert	Vector Laboratories, Inc., Burlingame, CA, USA	9 µl in 1000 µl TBS + 20 % SS
Pferd anti-Ziege IgG (H+L), biotinyliert	Vector Laboratories	9 µl in 1000 µl TBS + 1 % BSA
Ratte anti-Maus IgG (H+L)	Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc., West Grove, PA, USA	1:100 in TBS + 1 % BSA
Pferd anti-Maus IgG (H+L), biotinyliert	Vector Laboratories	9 µl in 1000 µl TBS + 1 % BSA

TBS: *tris buffered saline*; SS: Schweineserum; BSA: bovines Serumalbumin

3.1.3.2 Tertiärantikörper und Detektionssysteme

Die verwendeten Detektionssysteme und Tertiärantikörper sind in Tab. 4 aufgeführt.

Tab. 4: Übersicht über die verwendeten Detektionssysteme

Detektionssystem	Bezugsquelle	Verdünnung
Avidin-Biotin-Komplex (Vectastain® ABC Kit Peroxidase Standard)	Vector Laboratories	9 µl Avidin (A) + 9 µl Biotin (B) in 1000 µl TBS
Maus Peroxidase anti-Peroxidase (PAP)	Jackson ImmunoResearch	1:500 in TBS
Streptavidin (HRPO Conjugate)	Invitrogen	1:500 in TBS

TBS: *tris buffered saline*

3.1.3.3 Immunhistologischer Nachweis von OMP (*Olfactory marker protein*)

Zur immunhistologischen Darstellung der olfaktorischen Neurone wurde ein aus der Ziege stammender und gegen das *Olfactory marker protein* gerichteter Primärantikörper verwendet (Tab. 2). Als Kontrollserum wurde Ziegenserum verwendet (Tab. 1), welches entsprechend der Proteinkonzentration des Antikörpers verdünnt wurde. Als Sekundärantikörper diente ein biotinylierter Antikörper Pferd anti-Ziegen IgG und als Detektionssystem (Tab. 4) die ABC-Methode (HSU *et al.*, 1981; HERDEN *et al.*, 2000). Als positive Reaktion wurde eine braune, granuläre bis diffuse Färbung der Zellkerne sowie eine diffuse braune Färbung des Zytoplasmas und der Zellfortsätze der adulten Neurone gewertet. Positive Nervenfasern in der Lamina propria wiesen eine granuläre bis schollige Farbreaktion auf. Wenn nicht anders

angegeben, wurde die immunhistologische Untersuchung bei Raumtemperatur und nach folgendem Protokoll durchgeführt.

1. 4 µm dicke Gewebeschnitte auf SuperFrost® Plus Objektträger (R. Langenbrinck, Emmendingen) aufziehen und bei 60 °C für 30 min im Wärmeschrank trocknen.
2. Entparaffinisieren der Gewebeschnitte 3 x für 3 min in Xylol.
3. Rehydrieren in einer absteigenden Alkoholreihe, beginnend mit 2 x für 3 min Isopropanol, anschließend je 3 Minuten 96 % und 80 % Ethanol.
4. Inkubation der Schnitte für 30 min in Methanol mit 0,5 % frisch zugesetztem Wasserstoffperoxid (Wasserstoffperoxid 30 %, stabilisiert) zur Hemmung der endogenen Peroxidase.
5. Waschen der Schnitte 3 x für 5 min in TBS (siehe 8.1.2).
6. Inkubation der Schnitte in Zitratpuffer (pH 6,0; siehe 8.1.2) für 23 min in Plastikkuvetten im Wasserbad bei 95 °C zur Antigen-Demaskierung. Anschließend bei Raumtemperatur für 15 min abkühlen lassen und 1 x mit TBS spülen.
7. Umsetzen der Schnitte in Cassette Racks (Thermo Scientific, Runcorn, UK). Dazu werden die Schnitte auf die mit TBS angefeuchtete Rückseite von Shandon Coverplates™ (Thermo Scientific) angelegt.
8. Zum Blocken unspezifischer Bindungsstellen Inkubation der Schnitte für 20 min mit 1:5 in TBS verdünntem Pferdeserum.
9. Auftragen des Primärantikörpers OMP oder des Ziegenserums in der Verdünnung 1:3000 in TBS mit 1 % zugesetztem BSA.
10. Inkubation bei 4 °C über Nacht.
11. Waschen der Schnitte 3 x für 5 min mit TBS durch Einbringen von ca. 2 ml der Flüssigkeit in den Spalt zwischen Objektträger und Coverplate™.
12. Auftragen des biotinylierten Sekundärantikörpers Pferd anti-Ziege IgG und Inkubation für 30 min (9 µl in pro 1000 µl TBS + 1 % BSA).
13. Ansetzen des Avidin-Biotin-Komplexes (ABC) 30 min vor Gebrauch (9 µl Avidin + 9 µl Biotin in 1000 µl TBS).
14. Waschen der Schnitte wie unter Schritt 11. beschrieben.
15. Auftragen des ABC, Inkubation für 30 min.
16. Waschen der Schnitte wie unter Schritt 11. beschrieben.
17. Umsetzen der Schnitte in mit TBS gefüllte Glasküvetten.
18. Für die Farbreaktion 0,05%ige 3,3'-Diaminobenzidin-tetrahydrochlorid-Lösung (DAB) mit Imidazol-Puffer ansetzen (beides Sigma-Aldrich, St. Louis, USA; siehe 8.1.2) und unter Zugabe von 0,01 % H₂O₂ 3 min unter ständigem Rühren mittels Magnetrührer rühren lassen.

19. Waschen der Schnitte 3 x für 5 min mit TBS.
20. Waschen der Schnitte für 5 min in Aqua dest.
21. Inkubation der Schnitte für 5 min in Kardasewitsch (siehe 8.1.2) zur Entfernung des Formalinpigments.
22. Waschen der Schnitte für 5 min in Aqua dest., dabei Wasser einmal wechseln.
23. Gegenfärbung der Schnitte in Papanicolaous Hämatoxylin (siehe 8.1.2) für ca. 20 s.
24. Bläuen der Schnitte für 5 min in Leitungswasser.
25. Spülen der Schnitte für 5 min in Aqua dest.
26. Dehydrieren der Schnitte in einer aufsteigenden Alkoholreihe für je 3 min (1 x 50 %, 1 x 70 %, 1 x 80 %, 1 x 96 % Ethanol, 2 x Isopropanol).
27. Inkubieren der Schnitte 3 x für 3 min in Xylol.
28. Eindeckeln der Schnitte im Eindeckautomaten (Tissue-Tek® Coverslipper, Sakura Finetek) mit Xylol und Eindeckfilm (Tissue-Tek® SCA™, Sakura Finetek).

3.1.3.4 Immunhistologischer Nachweis von DCX (Doublecortin)

Zur Markierung juveniler Neurone des olfaktorischen Epithels wurde der aus der Ziege stammende und gegen das humane *Doublecortin* gerichtete Antikörper verwendet (Tab. 2). Ziegenserum diente als Kontrollserum und wurde entsprechend der Proteinkonzentration des Antikörpers verdünnt. Als Sekundärantikörper wurde ein biotinylierter Antikörper aus dem Pferd verwendet, der gegen Ziegen IgG gerichtet ist. Streptavidin diente dem Katalysieren der Farbreaktion. Als positive immunhistologische Reaktion wurde eine granuläre bis diffuse Färbung des Kerns und eine diffuse Anfärbung des Zytoplasmas und der Zellfortsätze der juvenilen Neurone gewertet. Die Nervenfasern in der Lamina propria wiesen im Falle einer positiven immunhistologischen Reaktion eine granuläre bis schollige Farbreaktion auf. Der Nachweis erfolgte nach folgendem Protokoll:

1. Wie in Schritten 1. bis 7. unter 3.1.3.3 beschrieben.
2. Zum Blocken unspezifischer Bindungsstellen Inkubation der Schnitte für 60 min mit 20 % Pferdeserum verdünnt in TBS mit 0,3 % Triton® X-100 (Serva Electrophoresis, Frankfurt).
3. Auftragen des Primärantikörpers DCX oder des Ziegenserums in der Verdünnung 1:250 in TBS mit 1 % zugesetztem BSA.
4. Weiter, wie in den Schritten 10. bis 12. unter 3.1.3.3 beschrieben.
5. Auftragen des Streptavidins in der Verdünnung 1:10.000 in TBS, Inkubation für 30 min.
6. Weiter, wie in den Schritten 16. bis 28. unter 3.1.3.3 beschrieben.

3.1.3.5 Immunhistologischer Nachweis von PCNA (*Proliferating cell nuclear antigen*)

Proliferierende Basalzellen wurden mit einem monoklonalen Primärantikörper aus der Maus, der gegen das PCNA gerichtet ist (Tab. 2), markiert. Als Kontrollserum wurde der Antikörper T1 (HIRSCHBERGER, 1987) in der gleichen Konzentration verwendet. Als Sekundärantikörper wurde ein Ratte anti-Maus Antikörper verwendet (Tab. 3), die Detektion erfolgte mittels der PAP-Methode (Tab. 4), modifiziert nach dem von Sternberger *et al.* (1979) etablierten Protokoll (HUISINGA, 2008). Eine positive immunhistologische Reaktion war durch eine fleckige bis diffuse Anfärbung von Kernen eines Teils der Basalzellen gekennzeichnet. Der Nachweis erfolgte nach dem dem folgenden Protokoll:

1. Wie in Schritten 1. bis 7. unter 3.1.3.3 beschrieben.
2. Zum Blocken unspezifischer Bindungsstellen Inkubation der Schnitte für 10 min mit 10 % Rattenserum in TBS verdünnt.
3. Auftragen des Primärantikörpers PCNA oder des Kontrollantikörpers T1 in der Verdünnung 1:100 mit TBS mit 1 % BSA.
4. Weiter, wie in den Schritten 10. bis 11. unter 3.1.3.3 beschrieben.
5. Auftragen des Sekundärantikörpers Ratte anti-Maus IgG in der Verdünnung 1:100 und Inkubation für 30 min.
6. Waschen der Schnitte wie unter Schritt 10 in 3.1.3.3 beschrieben.
7. Auftragen des Maus-PAP in der Verdünnung 1:500 in TBS, Inkubation für 30 min.
8. Weiter, wie in den Schritten 16. bis 28. unter 3.1.3.3 beschrieben.

3.1.3.6 Immunhistologischer Nachweis von TrkA (*Tyrosinkinase-Rezeptor-A*)

Zur Darstellung der horizontalen Basalzellen wurde ein polyklonaler Antikörper aus dem Kaninchen, der gegen den C-Terminus des humanen Tyrosinkinase-Rezeptors-A gerichtet ist, ausgewählt (Tab. 2). Als Kontrollserum wurde Kaninchenserum in entsprechender Konzentration verwendet. Die Detektion erfolgte hierbei mit einem biotinylierten Ziege anti-Kaninchen-Sekundärantikörper (Tab. 3) und der von Hsu *et al.* (1981) etablierten ABC-Methode (Tab. 4), die entsprechend der antikörperspezifischen Anforderungen modifiziert wurde (HERDEN *et al.*, 2000). Eine positives immunhistologisches Signal war durch eine braune, granuläre zytoplasmatische und, je nach Schnittebene, ringförmige Anfärbung des Zytoplasmas und der Zellmembran eines Teils der Basalzellen gekennzeichnet. In manchen Bereichen griff diese Färbung auch auf den Zellkern über. Daneben konnte eine granuläre, hellbraune Farbreaktion im Zytoplasma der Stützzellen gesehen werden, die oft apikal des Zellkerns ausgeprägt war, jedoch floss diese nicht mit in die semiquantitative Auswertung

ein, da hier nur die horizontalen Basalzellen beurteilt werden sollten. Der Nachweis erfolgte nach dem folgenden Protokoll:

1. Wie in Schritten 1. bis 7. unter 3.1.3.3 beschrieben.
2. Zum Blocken unspezifischer Bindungsstellen Inkubation der Schnitte für 15 min mit 20 % Schweineserum verdünnt in TBS.
3. Auftragen des Primärantikörpers TrkA oder des Kaninchen-Kontrollserums in der Verdünnung 1:100 in TBS mit 20 % Schweineserum.
4. Weiter, wie in den Schritten 10. bis 11. unter 3.1.3.3 beschrieben.
5. Auftragen des biotinylierten Sekundärantikörpers Ziege anti-Kaninchen IgG und Inkubation für 30 min (9 µl pro 1000 µl in TBS + 20 % SS).
6. Weiter, wie in den Schritten 13. bis 28. unter 3.1.3.3 beschrieben.

3.1.3.7 Immunhistologischer Nachweis weiterer Marker

Neuronenspezifischen Enolase (NSE)

Als weiterer Marker zur Darstellung der Nervenzellen des Riechepithels wurde ein monoklonaler Antikörper aus der Maus getestet, der gegen die γ -Untereinheit der NSE des Rindes gerichtet ist (Tab. 2). Als Kontrollserum wurde der Antikörper T1 in der gleichen Konzentration verwendet (HIRSCHBERGER, 1987). Als Sekundärantikörper diente ein biotinylierter Antikörper aus dem Pferd, der gegen die Maus gerichtet ist (Tab. 3). Als Detektionssystem wurde auf die ABC-Methode (Tab. 4) zurückgegriffen (HSU *et al.*, 1981; HERDEN *et al.*, 2000). Eine positive Reaktion war durch eine feingranuläre bis diffuse Anfärbung der neuronalen Zellkerne gekennzeichnet. Eine deutliche zytoplasmatische Reaktion war nicht erkennbar. Der Nachweis erfolgte nach folgendem Protokoll:

1. Wie in Schritten 1. bis 7. unter 3.1.3.3 beschrieben.
2. Zum Blocken unspezifischer Bindungsstellen Inkubation der Schnitte für 10 min mit unverdünntem Pferdeserum.
3. Auftragen des Primärantikörpers NSE oder des Kontrollserums T1 in der Verdünnung 1:100 in TBS mit 1 % BSA.
4. Weiter, wie in den Schritten 10. bis 11. unter 3.1.3.3 beschrieben.
5. Auftragen des biotinylierten Sekundärantikörpers Pferd anti-Maus IgG und Inkubation für 30 min (9 µl pro 1000 µl TBS + 1 % BSA).
6. Weiter, wie in den Schritten 13. bis 28. unter 3.1.3.3 beschrieben.

Immunhistologischer Nachweis des *Neuron specific nuclear protein* (NeuN)

Der verwendete Marker stammte aus der Maus und ist gegen das neuronenspezifische nukleäre Antigen gerichtet (Tab. 2). Alle weiteren verwendeten Seren, Verdünnungen und das Protokoll entsprachen denen zum Nachweis der neuronenspezifischen Enolase (NSE). Die Verwendung dieses Markers resultierte in einer braunen, feingranulären bis diffusen immunhistologischen Färbung der Zellkerne von verschiedenen Zelltypen des OEs, darunter Neurone, Basalzellen und zum Teil auch Stützzellen.

Immunhistologischer Nachweis der Tyrosinhydroxylase (TH)

Zur immunhistologischen Anfärbung von Nervenfasern in der Lamina propria wurde ein polyklonales Serum aus dem Kaninchen verwendet, das gegen die humane Tyrosinhydroxylase gerichtet ist (Tab. 2). Als Sekundärantikörper diente ein biotinyliertes Antiserum aus der Ziege, das gegen Kaninchen IgG gerichtet ist (Tab. 3). Zur Detektion wurde Streptavidin benutzt (Tab. 4). Kaninchenserum in der dem Antikörper entsprechenden Konzentration diente als Kontrollserum. Eine positive immunhistologische Reaktion war durch eine fleckige oder streifenförmige Anfärbung der Nervenfasern in der Lamina propria gekennzeichnet. Der Nachweis erfolgte nach folgendem Protokoll:

1. Wie in den Schritten 1. bis 7. unter 3.1.3.3 beschrieben.
2. Zum Blocken unspezifischer Bindungsstellen Inkubation der Schnitte für 20 min mit unverdünntem Schweineserum.
3. Auftragen des Primärantikörpers TH oder des Kaninchenserums in der Verdünnung 1:100 in TBS mit 1 % BSA.
4. Weiter, wie in den Schritten 10. bis 11. unter 3.1.3.3 beschrieben.
5. Auftragen des biotinylierten Sekundärantikörpers Ziege anti-Kaninchen IgG und Inkubation für 30 min (9 µl in pro 1000 µl TBS + 1 % BSA).
6. Auftragen des Streptavidins in der Verdünnung 1:10.000 in TBS und Inkubation für 30 min.
7. Weiter, wie in den Schritten 16. bis 28. unter 3.1.3.3 beschrieben.

3.1.3.8 Semiquantitative Auswertung der Immunhistologie

Entsprechend der H&E-Auswertung wurde untersucht, wie hoch der Anteil der immunhistologisch positiven Zellen des jeweiligen Zelltyps, bezogen auf das auf dem gesamten Gewebeschnitt vorhandene olfaktorische Epithel, war. So ergaben sich folgende Bewertungsstufen:

-
- | | |
|---|---|
| 0 | keine antikörperspezifische Markierung auf dem Gewebeschnitt |
| 1 | < 30 % immunhistologisch positive Zellen des jeweiligen Zelltyps |
| 2 | 30 - 70 % immunhistologisch positive Zellen des jeweiligen Zelltyps |
| 3 | > 70 % immunhistologisch positive Zellen des jeweiligen Zelltyps |

Es wurde eine dreifaktorielle Varianzanalyse der immunhistologischen Marker OMP, DCX, PCNA und TrkA mit Messwiederholungen bezüglich Querschnitt, Lokalisation und Marker durchgeführt, um zu untersuchen, ob Unterschiede in der Anzahl markierter Zellen bestehen und ob diese abhängig von Querschnitt oder Lokalisation sind (zwei- oder dreifache Wechselwirkung; 3.1.5). Außerdem wurde ermittelt, ob eine Rangkorrelation zwischen Typ des olfaktorischen Epithels und Expression der immunhistologischen Marker besteht. Dazu wurde der Rangkorrelationskoeffizient r_s nach Spearman berechnet (3.1.5).

3.1.4 Immunhistologische Untersuchung der Rattennase

Um mögliche Unterschiede in der Expression immunhistologischer Marker zwischen Ratte und Pferd aufzudecken, wurden die im Pferd verwendeten Antikörper auch für die Rattennase getestet. Es wurde darauf geachtet, die verwendeten Protokolle so wenig wie möglich abzuändern, um eine gute Vergleichbarkeit zu gewährleisten. Notwendige Anpassungen zur Detektion des jeweiligen Antigens sind in Tab. 5 dargestellt. Als Untersuchungsmaterial wurden Formalin-fixierte, EDTA-entkalkte und in Paraffin eingebettete Rattennasen verwendet. Hierbei handelte es sich um die Kontrolltiere des unter 3.2.2 beschriebenen Versuchs. Die Aufarbeitung entsprach der der Pferdenasen. Jedoch wurden die Proben nicht in Klotzcher Lösung zwischengelagert und die Entkalkungszeit wurde entsprechend der Probengröße verringert. Der Marker NSE ließ sich nicht für die Ratte etablieren und ist aus diesem Grund nicht in der Tabelle aufgeführt.

Tab. 5: Zusammenfassung der veränderten Reaktionsbedingungen für die immunhistologische Untersuchung der Rattennasen

Primärantikörper	Verdünnung	Blocken
	Vorbehandlung	Detektion
Ziege anti-Doublecortin (DCX (C-18))	1:250 in TBS + 1 % BSA Target Retrieval Solution Ready-to-Use (Dako), 23 min	20 % PS + 0,3 % Triton® X-100, 60 min Streptavidin
Kaninchen anti-Tyrosinkinase-Rezeptor-A (TrkA (763))	1:750 in TBS + 20 % SS keine	20 % SS, 15 min ABC
Maus anti-Neuronal Nuclei (Neuron Specific Nuclear Protein)	1:50 in TBS + 1 % BSA Zitratpuffer (pH 6,0), 23 min	PS unverdünnt, 10 min Streptavidin

TBS: *tris buffered saline*; BSA: bovines Serumalbumin; PS: Pferdeserum; SS: Schweineserum; ABC: Avidin-Biotin-Komplex Methode

3.1.5 Statistische Datenanalyse der Charakterisierung des olfaktorischen Epithels

Die statistische Auswertung wurde von der Arbeitsgruppe Biomathematik und Datenverarbeitung des Fachbereichs Veterinärmedizin der Justus-Liebig-Universität Gießen mit dem Statistikprogrammpaket BMDP/Dynamic, Release 8.1 durchgeführt.

Für die zwei- (3.1.2.1) und dreifaktorielle (3.1.2.2, 3.1.3.8) Varianzanalyse wurde das Programm BMDP2V genutzt. Mit dem Programm BMDP3D wurde der Rangkorrelationskoeffizient nach Spearman berechnet (3.1.3.8). Bei den Bewertungen wurde ein Signifikanzniveau $\alpha=0,05$ zugrunde gelegt. Ergebnisse mit $p \leq 0,05$ wurden als statistisch signifikant bewertet. Zusätzlich wurden ein exakter Friedman-Test durchgeführt (3.1.2.1, 3.1.2.2), dem eine α -Adjustierung nach Bonferoni-Holm zugrunde gelegt wurde. Für diese Auswertung wurde das Programm Cytel Studio StatXact Vers. 9.0.0 (2010) verwendet.

3.2 EXPERIMENTELLE INTRANASALE INFEKTION VON LEWIS-RATTEN

Alle Eingriffe an den Ratten wurden entsprechend des vom Regierungspräsidium Gießen genehmigten Tierversuches V-54 - 19 c 20-15 (1) Nr. 102-2011 durchgeführt.

3.2.1 Herstellung der Virussuspension und der Mock-Gehirnsuspension

3.2.1.1 Versuchstiere

Zunächst wurde eine ausreichend große Menge Virussuspension hergestellt werden. Hierzu wurde eine Viruspassage in einem Wurf neugeborener Lewis-Ratten durchgeführt. Das dazu verwendete Gehirnhomogenat (BV-E7 NB-4P/2 vom 24.03.1988, Virustiter: 6×10^6 ID₅₀/ml)

wurde freundlicherweise von Frau Dr. Herzog, Institut für Virologie der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Verfügung gestellt. Zur Herstellung der Mock-Gehirnsuspension wurden fünf 5 Wochen alte gesunde Ratten verwendet.

3.2.1.2 Versuchsbedingungen

Die Tiere wurden im Zentralen Tierlabor der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Zucht paarweise in Makrolon Typ IV Käfigen mit erhöhtem Gitterdeckel (EHRET Labor- und Pharmatechnik, Emmendingen) bei einem 12-stündigen Tag-Nacht-Rhythmus gehalten. Für die Infektionsversuche wurden die Muttertiere zusammen mit dem Wurf in der Tierversuchsanlage des BSL-3-Labors der Philipps-Universität Marburg, welches im Unterdruck betrieben wird, in Makrolon Typ III IVCs (*individually ventilated cages*; Bio. A.S.®, Ehret) bei ebensolchem Tag-Nacht-Rhythmus gehalten. Nach dem Absetzen am 24. Lebenstag wurden die Ratten nach Geschlechtern getrennt in Kleingruppen in den IVCs entsprechend der Empfehlungen der GV-SOLAS zusammen gehalten. Die Raumtemperatur betrug in beiden Tierhaltungen ca. 24 °C und die Luftfeuchtigkeit lag bei ca. 55 %. Als Futtermittel wurde konventionelles Zuchtfutter (Diätfutter für Zuchttiere, Altromin®, Lage) verwendet.

3.2.1.3 BDV-Infektion

Die neonatalen Ratten wurden innerhalb der ersten 24 Lebensstunden intrazerebral mit der vorhandenen Gehirnsuspension infiziert. Hierzu wurde die Virussuspension 1:10 mit auf 37 °C vorgewärmten Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM, *low glucose*, Gibco, Carlsbad, USA) verdünnt und mittels einer 10 µl-Hamiltonspritze und einer 5 mm langen Nadel (Sonderanfertigung, 26 Gauge; Hamilton®, Bonaduz, Schweiz über CS-Chromatographie Service, Langerwehe) in die vordere linke Gehirnhemisphäre injiziert. Um ein zu tiefes Einstechen zu verhindern, wurde ein zusätzlicher Dichtungsring der Spritze als Stopper auf die Nadel aufgesetzt. Nach der Infektion wurden die Tiere bis zum Absetzen im Alter von 24 Lebenstagen beim Muttertier in der Versuchstierhaltung des BSL-3-Labors belassen.

3.2.1.4 Euthanasie und Sektion

Euthanasie und Sektion erfolgten 36 Tage nach der Infektion (*days post infection, dpi*). Die Tiere wurden mit einer Isofluran-Inhalationsnarkose bis zur Areflexie betäubt und den behördlichen Auflagen entsprechend getötet. Um das Gehirn steril zu entnehmen, wurde vor dem Absetzen des Kopfes das Fell mit 70%igem Ethanol desinfiziert. Für die Arbeitsschritte des Abziehens des Fells, des Eröffnens der Schädelkalotte, sowie des Entnehmens des

Gehirns wurde jeweils ein neuer Satz eines sterilen Präparierbestecks verwendet. Die entnommenen Gehirne wurden gewogen und bis zur weiteren Verwendung in sterilen 50 ml Reaktionsröhrchen (Sarstedt, Nümbrecht) auf zerkleinertem Eis gelagert. Ebenso wurde mit den 5 Wochen alten Ratten zur Herstellung der Mock-Gehirnsuspension verfahren

3.2.1.5 Herstellung der Virussuspension

Aus den entnommenen Gehirne wurde mit DMEM (*low glucose*, Gibco), supplementiert mit 2 % inaktiviertem FCS (*fetal calf serum*, PAA), eine 10%ige Suspension hergestellt. Dazu wurden die Gehirne mit einem Ultraschallstab beschallt, zentrifugiert, der Überstand abgenommen, aliquotiert und bei -80 °C gelagert.

Im Anschluss erfolgte eine Virustiterbestimmung, die freundlicherweise von Frau Dr. Herzog, Institut für Virologie, Fachbereich Veterinärmedizin, Justus-Liebig-Universität Gießen durchgeführt wurde. Hierbei konnte ein Titer von 2×10^7 ID₅₀/ml bestimmt werden. Die Herstellung der Mock-Gehirnsuspension wurde nach der Entnahme der Gehirne von Frau Dr. Herzog nach dem oben beschriebenen Protokoll durchgeführt.

3.2.2 Intranasale Infektion adulter Lewis-Ratten

3.2.2.1 Versuchstiere

Für die *In-vivo*- und *In-vitro*-Infektionsversuche (3.3) wurden 28 Tage alte Lewis-Ratten aus dem Zentralen Tierlabor der Justus-Liebig-Universität Gießen verwendet. Die Ratten wurden zur Erhaltungszucht unter den in 3.2.1.2 beschriebenen Bedingungen gehalten.

3.2.2.2 Versuchsbedingungen für die In-vivo-Versuche

Die Versuche wurden in der Tierhaltung des BSL-3-Labors der Philipps-Universität Marburg durchgeführt. Die Tiere wurden täglich adspektorisch kontrolliert und bis 14 dpi Versuchsdauer alle drei bis vier bzw. bei längeren Versuchszeitpunkten jeden zweiten Tag eingehend klinisch untersucht. Die Beurteilung erfolgte anhand eines Score Sheets, das zuvor zusammen mit der Tierschutzbeauftragten der Justus-Liebig-Universität Gießen, Frau Dr. Peters, erarbeitet wurde (siehe 8.3.2: Tab. 27, Tab. 28 und Tab. 29).

3.2.2.3 BDV-Infektion der Versuchstiere

Die Ratten wurden intranasal mit der unter 3.2.1.5 beschriebenen Virussuspension infiziert. Um eine mögliche Kreislaufbelastung der Tiere durch eine Narkose zu umgehen, wurden die Ratten einige Tage vor der Infektion an ein intensiveres Handling gewöhnt, sodass ein

stressarmes Fixieren für ca. 90 Sekunden und eine Berührung der Nasenöffnungen möglich war. Pro Nasenloch wurden 100 µl Virussuspension appliziert. Hierzu wurde die Gehirnsuspension 1:100 mit DMEM (*low glucose*, Gibco) verdünnt und in eine Spritze mit stumpfer Kanüle (beides B. Braun, Melsungen) aufgezogen. Die so zielgenau an den Nasenlöchern applizierbaren Tropfen der Virussuspension wurden von den Versuchstieren aktiv in die Nasenlöcher eingesogen. Die Anzahl der infizierten und Mock-infizierten Tiere sowie die Tötungszeitpunkte nach der Infektion sind in Tab. 6 aufgeführt.

Tab. 6: Zeitpunkte der Tötung nach der Infektion sowie Anzahl der Versuchstiere

Zeitpunkt p.i.	3 h	18 h	1 d	2 d	4 d	7 d	14 d	21 d
Anzahl infizierte Tiere	5	5	5	5	5	5	5	2
Anzahl Mock-infizierte Tiere	2	/	2	2	2	2	2	2

p.i.: *post infection*; h: Stunden; d: Tage

3.2.2.4 Mock-Infektion

Die Mock-Infektion erfolgte analog zu der unter 3.2.2.3 beschriebenen Infektionsweise. Es wurde hierbei jedoch Gehirnhomogenat von nicht-infizierten Ratten verwendet (siehe 3.2.1.5). Eine Übersicht der verwendeten Tiere findet sich in Tab. 6.

3.2.2.5 Euthanasie und Sektion

Die Tiere, die für die *In-vivo*-Infektionsversuche (siehe 3.1.2.3) verwendet wurden, wurden nach den entsprechenden Zeitpunkten mit Isofluran bis zur vollständigen Areflexie betäubt und durch Dekapitation, entsprechend der behördlichen Auflagen im Rahmen des genehmigungspflichtigen Tierversuchs, getötet. Die Sektion wurde sofort nach der Euthanasie durchgeführt.

3.2.2.6 Gewinnung und Aufarbeitung des Probenmaterials

Bei der Sektion der Tiere wurde nach dem Eintritt des Todes der Kopf und der Halsbereich mit 70%igem Ethanol desinfiziert. Der Kopf wurde abgetrennt, enthäutet und das Gehirn entnommen. Mit einer feinen Allzweck-Bügelsäge wurde die Nase wenige mm rechts der Medianen aufgesägt. Eine Übersicht über die asservierten Proben ist in Tab. 7 zu finden.

Tab. 7: Proben aus den *In-vivo*-Infektionsversuchen und Lagerung

Proben	Nase		Gehirn	
	linke Hälfte	rechte Hälfte (rostraler und caudaler Bereich der Nasenschnecken)	linke Hälfte	rechte Hälfte eingebettet in OCT- Einbettmedium (Tissue-Tek® O.C.T.™ Compound, Sakura)
Lagerung	10 % Formalin	-80 °C	10 % Formalin	-80 °C

Das Gehirn wurde in 10 % Formalin fixiert und, wie unter 3.1.1 beschrieben, in Paraffin eingebettet. Die Nasen wurden mit einer Diamant-Bandsäge in wenige Millimeter dicke Scheiben gesägt. Der erste Sägeschnitt wurde stets auf der Höhe des Übergangs des Bulbus olfactorius zum Ethmoid angesetzt. Je nach Größe und Alter des Tieres war es so möglich, 7 - 8 Querschnitte der Nase zu gewinnen, bei denen eine Zuordnung zur entsprechenden Lokalisation stets sichergestellt war. Die Querschnitte wurden anschließend für ca. 7 Tage in EDTA (siehe 8.1.1) im Wärmeschrank bei 37 °C entkalkt. Der Wechsel der EDTA-Lösung erfolgte jeden zweiten Tag. Vor der routinemäßigen Paraffin-Einbettung wurden die Proben über Nacht in Leitungswasser gewässert. Eine Übersicht über die Anzahl der für die morphologischen Untersuchungen verwendeten Versuchstiere ist in Tab. 8 zu finden.

Tab. 8: Anzahl der für die histologischen Untersuchungen verwendeten Versuchstiere

Zeitpunkt p.i.	3 h	18 h	1 d	2 d	4 d	7 d	14 d	21 d
H&E Nase, ZNS (BDV/Mock)	5/2	5/-	5/2	5/2	5/2	5/2	5/2	2/2
IHC BDV-N Nase (BDV/Mock)	5/5	5/-	5/2	5/2	5/2	5/2	5/2	2/2
IHC BDV-N Gehirn (BDV/Mock)	5/2	5/-	5/2	5/2	5/2	5/2	5/2	2/2
IHC PCNA (BDV/Mock)	-/-	-/-	-/-	3/2	3/2	3/2	-/-	-/-
ISH Nase (BDV/Mock)	5/-	5/-	5/1	5/-	5/-	5/-	5/1	2/-
ISH Gehirn (BDV/Mock)	-/-	5/-	-/1	-/-	5/2	5/2	5/1	-/-

p.i.: *post infection*; h: Stunden; d: Tage; H&E: Hämatoxylin und Eosin; IHC: Immunhistologie; ISH: *In-situ*-Hybridisierung; BDV-N: BDV Nukleoprotein; PCNA: *Proliferating cell nuclear antigen*; -: nicht durchgeführt

3.2.3 Histopathologische Untersuchung der Versuchstiere

3.2.3.1 H&E-Färbung von Gehirn und Nase der Versuchstiere

Von allen gewonnenen Gewebeproben aus Nase und Gehirn wurde H&E-Färbungen angefertigt (siehe 3.1.2). Dazu wurden ca. 4 µm dicke Gewebeschnitte angefertigt und auf Objektträger (Süßefrost Labortechnik) aufgezogen.

3.2.3.2 Auswertung

Bei der pathohistologischen Untersuchung wurde qualitativ beurteilt, ob entzündliche und degenerative Veränderungen in Gehirn und Nase vorliegen. Insbesondere wurde auf perivaskuläre Entzündungszellinfiltrate und Gliaaktivierung im Gehirn geachtet.

3.2.4 Immunhistologische Untersuchung der Versuchstiere

3.2.4.1 Immunhistologischer Nachweis von BDV-N

Die Untersuchung der Versuchstiere auf das Vorhandensein des BDV-Nukleoproteins erfolgte immunhistologisch mit der ABC-Methode (HSU *et al.*, 1981; HERDEN *et al.*, 2000) und dem von Frau Dr. Herzog, Institut für Virologie der Justus-Liebig-Universität Gießen, zur Verfügung gestellten monoklonalen Antikörper Bo18, der gegen das BDV-Nukleoprotein gerichtet ist. Als Kontrolle wurde der Antikörper T1 in der gleichen Konzentration verwendet (siehe unten). Als Sekundärantikörper diente ein biotinylierter Antikörper aus dem Pferd, der gegen Maus IgG gerichtet ist. Als Positivkontrolle wurden bei jeder Immunhistologie Gehirnschnitte von einem Pferd mit natürlicher BDV-Infektion verwendet. Soweit nicht anders angegeben, erfolgten die Arbeitsschritte des folgenden Protokolls bei Raumtemperatur und in Glasküvetten mit zugehörigen Glaseinsätzen.

1. Wie in den Schritten 1. bis 5. unter 3.1.3.3 beschrieben.
2. Umsetzen der Schnitte in Cassette Racks (Thermo Scientific). Dazu wurden die Schnitte auf die mit TBS angefeuchtete Rückseite von Shandon Coverplates™ (Thermo Scientific) angelegt.
3. Zum Blocken unspezifischer Bindungsstellen Inkubation der Schnitte für 30 min mit 1:5 in TBS verdünntem Pferdeserum.
4. Auftragen des Primärantikörpers Bo18 oder des Kontrollserums T1 in der Verdünnung 1:500 in TBS mit 1 % BSA.
5. Inkubation bei 4 °C über Nacht.

6. Spülen 3 x für 5 min mit TBS durch Einbringen von circa 2 ml der Flüssigkeit in den Spalt zwischen Objektträger und Coverplate™.
7. Auftragen des biotinylierten Sekundärantikörpers Pferd anti-Maus IgG und Inkubation für 30 min (9 µl pro 1000 µl in TBS + 1 % BSA).
8. Weiter, wie in Schritten 13. bis 28. unter 3.1.3.3 beschrieben.

3.2.4.2 Auswertung der Immunhistologie

Die immunhistologische Untersuchung zum Nachweis von BDV-N erfolgte für die in Tab. 8 aufgeführten Tiere semiquantitativ nach folgender Bewertung lichtmikroskopisch mit einem 20x Objektiv (Nikon Eclipse 80i):

- | | |
|---|--|
| 0 | keine markierten Zellen auf dem gesamten Gewebeschnitt |
| 1 | bis zu 10 markierte Zellen auf dem Gewebeschnitt verteilt |
| 2 | zwischen 10 und 60 markierte Zellen auf dem Gewebeschnitt verteilt oder in Nestern liegend |
| 3 | mindestens 60 markierte Zellen auf dem Gewebeschnitt verteilt oder in Nestern liegend |

Dabei wurden die verschiedenen Zelltypen des olfaktorischen Epithels, der darunter liegenden Lamina propria und der Nervenfasern jeweils gesondert betrachtet und bewertet. Das obige Bewertungsschema gilt ebenso für die Nervenfasern. Bewertet wurden adulte und juvenile olfaktorische Neurone, Stützzellen, proliferierende und horizontale Basalzellen sowie Nervenfasern und olfaktorische Hüllzellen. Als positive Reaktion wurden braune DAB-Farbniederschläge bewertet, die sich in der gleichen Ebene wie der Gewebeschnitt befanden und nicht in den Negativkontrollen und nicht in den Mock-infizierten Tieren vorhanden waren. Grundsätzlich wurde bei der Untersuchung des olfaktorischen Epithels zwischen einer intranukleären und einer zytoplasmatischen Reaktion unterschieden. Erstere zeigte sich in Form von einzelnen bis zahlreichen intranukleär gelegenen runden Granula oder durch eine fleckige bis diffuse Braunfärbung des Karyoplasmas. Die zytoplasmatische positive Reaktion zeigte sich hingegen meist in Form einer fleckigen bis gleichmäßigen braunen Färbung des Zytoplasmas und der Zellfortsätze. Im Gehirn konnte zusätzlich eine immunhistologische Reaktion des Neuropils beobachtet werden, die diffus oder strahlenförmig um positive Zellen zu finden war, bei der jedoch keine zellulären Komponenten sicher benannt werden konnten. Die gewonnenen Daten gingen in die statistische Datenanalyse ein (siehe 3.2.7).

3.2.5 Immunhistologische Untersuchung des *Proliferating cell nuclear antigen* (PCNA) bei BDV-infizierten und Mock-infizierten Lewis-Ratten

Um zu untersuchen, ob die intranasale Infektion der Lewis-Ratten einen Einfluss auf die Proliferation der Vorläuferzellen des olfaktorischen Epithels hatte, wurde das *Proliferating cell nuclear antigen* (PCNA) immunhistologisch nachgewiesen. Die Untersuchung wurde bei je drei Ratten der Untersuchungszeitpunkte 2, 4 und 7 dpi (siehe Tab. 8) durchgeführt und mit dem Ergebnis der beiden Mock-infizierten Tiere des jeweiligen Zeitpunktes verglichen. Die immunhistologische Untersuchung wurde entsprechend des unter 3.1.3.5 aufgeführten Protokolls durchgeführt.

3.2.5.1 Auswertung

Die immunhistologische Auswertung wurde mit dem Programm NIS Elements BR 3.2 und dem Nikon Eclipse 80i vorgenommen. Es wurden pro Tier 20 Strecken des olfaktorischen Epithels mit je 250 µm Länge abgemessen und die immunhistochemisch markierten Kerne der proliferierenden Basalzellen gezählt. Die spezifische Markierung war durch eine braune, meist feingranuläre oder diffuse Färbung ausschließlich des Zellkerns charakterisiert. Diese lag in einer Ebene mit dem Gewebeschnitt und war nicht in der Negativkontrolle vorhanden. In dem gleichen Epithelanschnitt wurden außerdem die gleichartig gefärbten Kerne der Stützzellen gezählt und notiert. Die Daten wurden für eine zweifaktorielle Varianzanalyse mit Gruppierung nach Infektion und Zeit genutzt (siehe 3.2.7).

3.2.6 *In-situ*-Hybridisierung der Versuchstiere (ISH)

Für die ISH der Versuchstiere wurden zwei Digoxigenin-markierte RNA-Sonden hergestellt und verwendet, die komplementär zum viralen Genom oder zur mRNA, die für das BDV-N-Protein codiert, waren. Die sogenannte sense-Sonde wies dabei das virale Genom (Negativstrang), die antisense-Sonde die virale mRNA (Positivstrang) nach, wie bereits bei Porombka *et al.* und Werner-Keišs *et al.* beschrieben (POROMBKA, 2006; WERNER-KEIŠS, 2006). Ausgangsmaterial war ein nicht-linearisiertes Plasmid (BDV-N outer), das von Porombka (2006) mit dem TOPO TA Cloning® Kit for Sequencing (Life Technologies™, Carlsbad, USA) hergestellt wurde. Das BDV-N-Sequenz des Insert wies eine Länge von 342 bp auf, die Gesamtlänge zwischen M13R und M13F betrug 507 bp, da 165 bp des Vektors hinzu kommen (GenBank® Accession-Nummer AF158629, Position: 87-428).

Als Kontrollen wurden bei jeder ISH 3 Gehirnschnitte eines natürlich BDV-infizierten Pferdes mitgeführt. Je ein Schnitt wurde mit der sense- und der antisense-Sonde inkubiert. Auf den dritten Schnitt wurde der Hybridisierungs-Mix als Negativkontrolle aufgetragen.

3.2.6.1 Sondenherstellung

Isolierung der Plasmid-DNA aus den Glycerolstocks

Die Kultivierung der vorhandenen Glycerolstocks wurde wie bei Porombka, 2006 (POROMBKA, 2006) durchgeführt. Die Isolierung der Plasmid-DNA erfolgte mit den nexttec™ cleanColumns (nexttec™ DNA isolation systems; Nexttec, Leverkusen) nach Herstellerangaben.

Amplifikation des spezifischen Inserts

Um das spezifische BDV-N-Insert des Plasmids (Plasmid III BDV-N) zu vermehren und eine Matrize zur Herstellung der Sonde zu generieren, wurde eine PCR entsprechend der Protokolle von Porombka bzw. Werner-Keišš durchgeführt (POROMBKA, 2006; WERNER-KEIŠŠ, 2006). Die für die jeweiligen Sonden verwendeten Primerkombinationen sind in der Tab. 9 aufgeführt. Es wurde hierbei jeweils ein spezifischer Primer und mit M13 *forward* oder M13 *reverse* je ein universeller Primer verwendet.

Tab. 9: Verwendete Primerkombinationen zur Amplifikation der BDV-N-spezifischen Inserts

Bezeichnung Sonde (Detektion)	Primer Sequenz (5' - 3')	Enzym	Sonden-größe	GenBank® Accession-Nummer (Position)
sense (-ssRNA)	BDV-N antisense (p335) AAT GAG CAA CAA TGG CTG AA	T7	342 nt + 36 nt	AF158629 (87-428)
	M13 <i>forward</i> (M13F) GTA AAA CGA CGG CCA G			
antisense (+ssRNA)	BDV-N sense (p334) CCC CGG AAA ATT CCT ACA AT	T3	342 nt + 36 nt	AF158629 (87-428)
	M13 <i>reverse</i> (M13R) CAG GAA ACA GCT ATG AC			

-ssRNA: genomische RNA; +ssRNA: positivsträngige RNA; BDV-N: BDV-Nukleoprotein; p334, p335: interne Primerbezeichnungen; T3: T3 RNA Polymerase; T7: T7 RNA Polymerase; nt: Nukleotide; Sondengröße: Amplifikatgröße + 36 nt Plasmidanteil

Die PCR erfolgte wie in Tab. 10 angegeben. Alle Pipettierschritte wurden auf Eis durchgeführt. Die Amplifikation erfolgte in einem Multicycler® PTC 200 (Biozym Scientific,

Hessisch Oldendorf). Die aus der Plasmid-Isolierung gewonnene DNA wurde mit sterilem DEPC-Wasser 1:1000 verdünnt in die PCR eingesetzt.

Tab. 10: Reagentien für die PCR zur Amplifikation der BDV-N-spezifischen Inserts

Komponente	Konzentration der Stammlösung	Volumen in μl	Konzentration im 25 μl -Ansatz
DEPC-Wasser	-	18,9	-
Puffer	-	2,6	-
dNTP	10x	0,6	0,25x
Polymerase	5x	0,2	0,04x
BDV-N-spezifischer Primer	10 pmol/ μl	0,6	0,25 pmol/ μl
Universeller Primer	10 pmol/ μl	0,6	0,25 pmol/ μl
Plasmid-DNA (1:1000)	-	2	-

DEPC: Diethylpyrocarbonat; dNTP: Desoxyribonukleosidtriphosphat; BDV-N: BDV-Nukleoprotein

Die aufeinander folgenden Reaktionsschritte sind in Tab. 11 aufgeführt.

Tab. 11: Reaktionsschritte der PCR zur Amplifikation des BDV-N-spezifischen Inserts

Reaktionsschritt	Zeit	Temperatur	Zyklen
1. Initiale Denaturierung	2 min	94 °C	-
2. Denaturierung	30 s	94 °C	34 x
3. Primeranlagerung	30 s	50 °C	
4. Elongation	1 min	72 °C	
5. Finale Elongation	10 min	72 °C	-
6. Kühlung	bis zur Probenentnahme	4 °C	-

Die mittels der oben beschriebenen PCR gewonnene DNA wurde aufgereinigt (siehe unten) und bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert.

Aufreinigung der DNA und Bestimmung des DNA-Gehalts

Die DNA wurde mit dem Amicon Ultra Centrifugal Filters 0,5 ml (EMD Millipore) nach Herstellerangaben aufgereinigt. Dazu wurden 23 μl der PCR Produkte eingesetzt und mit Wasser auf 500 μl aufgefüllt. Der Durchfluss enthielt zuletzt das gewünschte Endprodukt.

Im Anschluss wurde die DNA mit dem Nanodrop® 2000 (Thermo Fisher) spektralphotometrisch gemessen.

***In-vitro*-Transkription**

Die *In-vitro*-Transkription wurde mit dem DIG RNA Labeling Kit (SP6/T7) und der nicht im Kit vorhandenen T3 RNA Polymerase durchgeführt (beides Roche Diagnostics, Mannheim). Bei diesem Kit ist es möglich bis zu 1 µg aufgereinigter DNA einzusetzen. In zahlreichen Vorversuchen konnte ermittelt werden, dass die gemessene DNA-Konzentration meist lediglich bei 75-100 ng/µl nach dem Aufreinigen lag. Aus diesem Grund wurde die maximale Menge (10 µl) für eine Reaktion eingesetzt.

Die *In-vitro*-Transkription wurde nach dem folgenden Schema in Tab. 12 mit Kunststoff-Reaktionsgefäßen (1,5 ml, Sarstedt) durchgeführt. Die Mengenangaben beziehen sich auf einen Reaktionsansatz. Soweit nicht anders angegeben, wurde bei Raumtemperatur gearbeitet. Die Inkubationen bei 37 °C erfolgten in dem Heizblock Accublock™ Mini (Labnet International, Edison, USA).

Tab. 12: Reagentien für die *In-vitro*-Transkription zur Sondenherstellung

Komponente	Konzentration der Stammlösung	Volumen in µl	Konzentration im 20 µl-Ansatz
aufgereinigte DNA	-	10	-
DEPC-Wasser	-	3	-
NTP labeling mixture	10x	2	1x
Transcription buffer	5x	2	0,5x
RNase inhibitor	-	1	-
T3 (antisense-Sonde) oder T7 (sense-Sonde)	-	2	-

RNase Inhibitor: RiboLock™, Fermentas Life Sciences; T3: T3 RNA Polymerase; T7: T7 RNA Polymerase

1. Pipettieren der Komponenten aus Tab. 12 auf Eis.
2. Komponenten mischen, kurz zentrifugieren und für 2 h bei 37 °C inkubieren.
3. 2 µl DNase I (RNase-Free DNase; Qiagen, Venlo, Niederlande) zugeben und für 15 min bei 37 °C inkubieren um die Template-DNA zu entfernen.
4. Abstoppen der Reaktion mit 2 µl 0,2 M EDTA (pH 8,0, siehe 8.1.3).
5. Zugabe von 2,5 µl 4 M Lithiumchlorid, mischen, kurz zentrifugieren.
6. Zugabe von 75 µl reinem, eiskaltem Ethanol, mischen, kurz zentrifugieren und über Nacht bei -20 °C zur RNA-Fällung lagern.
7. Reaktionsgefäße bei 13.000x g in Eppendorf-Zentrifuge 5415C (Eppendorf, Hamburg) für 15 min zentrifugieren und Überstand vorsichtig abpipettieren.
8. RNA-Pellet mit 50 µl 70 % Ethanol überschichten und 5 min bei 13.000x g zentrifugieren.

9. Überstand abpipettieren und RNA-Pellet vollständig trocknen lassen.
10. RNA-Pellet mit 100 µl sterilem DEPC-Wasser resuspendieren, aliquotieren und bis zur Verwendung bei -80 °C lagern.

3.2.6.2 Durchführung der ISH zum Nachweis der viralen RNA

Die *In-situ*-Hybridisierung wurde in Anlehnung an das von Zurbriggen *et al.* (ZURBRIGGEN *et al.*, 1993) etablierte und von Porombka, Werner-Keišs und Wentz (POROMBKA, 2006; WERNER-KEIŠS, 2006; WENTZ, 2009) modifizierte Protokoll durchgeführt. Soweit nicht anders angegeben, wurde bei Raumtemperatur und mit sterilen Glaswaren gearbeitet. Die Herstellung der Lösungen ist im Anhang (8.1.3) aufgeführt. Sie wurden, wenn nicht anders angegeben, vor dem Gebrauch autoklaviert.

1. Aufziehen der 4 µm dicken Gewebeschnitte auf Superfrost Plus® Obekträger (R. Langenbrinck), für 30 min bei 60 °C im Wärmeschrank trocknen lassen.
2. Entparaffinisieren 3 x für 5 min in Xylol.
3. Rehydrieren in einer absteigenden Alkoholreihe, beginnend mit 5 min Isopropanol, gefolgt von je 5 min 96 % Ethanol und 70 % Ethanol.
4. Spülen der Schnitte für 5 min und 1 min in Aqua bidest./DEPC sowie für 5 min in PBS.
5. Inkubation der Schnitte für 20 min in 0,2 M HCl.
6. Waschen 2 x für 30 min mit 2x SSC + 5 mM EDTA bei 50 °C.
7. Vorbehandlung mit Proteinase K (8.1.3) für 15 min bei 37 °C.
8. Stoppen der Proteolyse durch Inkubation mit 0,2%igem Glycin-PBS für 5 min.
9. Inkubation für 4 min in 4 % Paraformaldehyd (PFA) zur Nachfixierung.
10. Spülen 2 x für 1 min mit PBS.
11. Spülen für 15 min mit PBS + 5 mM MgCl₂.
12. Acetylierung mit 0,25 % Acetanhydrid (Fluka, Neu-Ulm) in 0,1M Triethanolamin (Carl Roth, Karlsruhe), pH 7,5, für 10 min.
13. Waschen der Schnitte 2 x für 1 min und anschließend für 5 min mit PBS.
14. Prähybridisierung für mindestens 60 min bei 52 °C in Prähybridisierungspuffer (PHB-Mix).
15. Hybridisierung für ca. 16 Stunden in einer feuchten Kammer im Wärmeschrank mit Hybridisierungspuffer (HB-Mix) und den entsprechenden Sonden in der Konzentration 5 µl Sonde pro 100 µl HB-Mix. Je nach Schnittgröße werden 30-35 µl auf den liegenden Schnitt gegeben, das Gewebe mit Gelbond® (Biozym Scientific) abgedeckt und mit Fixogum® (Marabu, Tamm) abgedichtet.

16. Posthybridisierungswaschung nach manueller Entfernung der Abdeckung und Abdichtung in der Glasküvette: Inkubation 2 x für 15 min in 6x SSC + 45 % Formamid bei 42 °C.
17. Spülen der Schnitte 2 x für 5 min mit 2x SSC.
18. Verdau der nichtgebundenen RNA mit RNase-Lösung (8.1.3) für 30 min bei 37 °C.
19. Spülen der Schnitte 2 x für 5 min in 2x SSC und 2 x für 15 min in 0,2x SSC bei 50 °C.
20. Waschen für 1 min mit Puffer 1.
21. Inkubation in der Blocking-Lösung (Puffer 2) für 30 min.
22. Inkubation der liegenden Schnitte mit der DIG-Antikörper-Lösung (8.1.3) für zwei Stunden in der feuchten Kammer. Dazu die Objektträger um das Gewebe herum abtrocknen und die kurzen Seiten mit einem DAKO-PEN® (Dako) abdichten und je nach Gewebegröße 200-300 µl der Antikörperlösung auftragen.
23. Waschen der Schnitte 2 x für 15 min mit Puffer 1 in der Standküvette.
24. Waschen für 2 min in Puffer 3.
25. Inkubation für ca. 16 Stunden in der Farbreaktionslösung im Dunkeln.
26. Spülen der Schnitte 2 x für 10 min mit Puffer 4 im Dunkeln.
27. Spülen 2 x für 2 min mit Aqua bidest. und anschließend mit Leitungswasser bis zum Eindecken.
28. Eindecken der Schnitte mit auf 50 °C vorgewärmter Kaisers Glyceringelatine (Merck, Darmstadt).

3.2.6.3 ISH der Nasen und Gehirne der intranasal infizierten Ratten

Die *In-situ*-Hybridisierung wurde bei allen intranasal BDV-infizierten Versuchstieren mit dem Nasengewebe durchgeführt. Bei den Zeitpunkten 18 hpi sowie 4, 7 und 14 dpi wurden zusätzlich die rostralen Gehirnareale untersucht, da vor 14 dpi noch kein BDV-Antigen im Gehirn nachgewiesen werden konnte und untersucht werden sollte, ob sich virale RNA oder mRNA früher detektieren lässt als das virale Antigen. Als Positivkontrolle wurden Schnitte des Gehirns einer natürlich BDV-infizierten Pferdes mitgeführt. Als Negativkontrolle für die Untersuchung des olfaktorischen Epithels bzw. des Gehirns dienten entsprechende Gewebe von je einer Mock-infizierten Ratte (1 und 14 dpi) sowie Schnitte, die nur mit dem Hybridisierungsmix inkubiert wurden.

3.2.6.4 Auswertung der ISH

Die Auswertung erfolgte lichtmikroskopisch mit einem 20x Objektiv semiquantitativ und orientierte sich an dem für die Auswertung der BDV-N-Immunhistologie verwendeten

Schema. Die verwendeten Tiere sind in Tab. 8 aufgeführt. Die verschiedenen Zelltypen des olfaktorischen Epithels und das Vorhandensein von mRNA oder genomischer RNA wurden jeweils getrennt bewertet.

- 0 keine markierten Zellen auf dem Gewebeschnitt
- 1 bis zu 10 markierte Zellen auf dem Gewebeschnitt verteilt
- 2 zwischen 10 und 60 markierte Zellen auf dem Gewebeschnitt verteilt oder in Nestern liegend
- 3 mindestens 60 markierte Zellen auf dem Gewebeschnitt verteilt oder in Nestern liegend

Als positive Reaktion wurden hierbei dunkelblaue bis dunkelviolette Farbniederschläge bewertet, die sich in der gleichen Ebene wie der Gewebeschnitt befanden und in den Negativkontrollen und in den Mock-infizierten Tieren nicht vorhanden waren. Wie in der Immunhistologie konnte eine intranukleäre und eine zytoplasmatische Reaktion unterschieden werden. Die intranukleäre Reaktion zeigte sich in Form von meist wenigen intranukleär gelegenen rundlichen Granula. Die zytoplasmatische positive Reaktion zeigte sich meist in Form einer diffusen oder granulären Farbreaktion des Zytoplasmas und der Zellfortsätze. Im Gehirn konnte auch hier eine Farbreaktion des Neuropils beobachtet werden, die diffus oder strahlenförmig um positive Zellen zu finden war, bei der jedoch keine zellulären Komponenten zugeordnet werden konnten. Die Daten flossen in die statistische Datenanalyse ein (3.2.7).

3.2.7 Statistische Datenanalyse der *In-vivo*-Infektionsversuche

Die statistische Auswertung wurde von der Arbeitsgruppe Biomathematik und Datenverarbeitung des Fachbereichs Veterinärmedizin der Justus-Liebig-Universität Gießen durchgeführt. Um zu untersuchen, welchen Einfluss die Infektionsdauer auf das Vorhandensein von genomischer RNA und mRNA sowie von viralem Antigen hatte (3.2.4.2 , 3.2.6.4) bzw. wie sich die Infektion in den untersuchten Zelltypen ausbreitete, wurde ein exakter Kruskal-Wallis-Test durchgeführt. Damit ließen sich signifikante Unterschiede zwischen den einzelnen Zeitpunkten nach der Infektion herausstellen. Verwendet wurde hierzu das Programm Cytel Studio StatXact Vers. 9.0.0 (2010). Des Weiteren wurde mit der Rangkorrelation nach Spearman untersucht, ob es sich bei den Unterschieden im Nachweis des Antigens, sowie der viralen und der mRNA um einen monotonen Trend handelt oder ob die Infektion im Laufe der Zeit wieder abnimmt. Dazu wurde das Statistikprogrammpaket BMDP/Dynamic, Release 8.1 und Programm BMDP3D genutzt. Darüber hinaus wurde eine

zweifaktorielle Varianzanalyse mit Gruppierung nach Infektion und Zeit für den Nachweis von PCNA (3.2.5.2) mit dem Programm BMDP7D durchgeführt, um zu untersuchen, ob der Untersuchungszeitpunkt oder die BDV- bzw. Mock-Infektion einen Einfluss auf die Zahl der PCNA-positiven Zellen und damit auf die Proliferation des Epithels haben.

Für die Bewertung aller statistischen Untersuchungen wurde immer ein Signifikanzniveau von $\alpha=0,05$ zugrunde gelegt und Ergebnisse mit einem Wert von $p<0,05$ als statistisch signifikant bewertet.

3.3 DISSOZIATIONSKULTUR DES OLFAKTORISCHEN EPITHEL

Für die *In-vitro*-Versuche wurden die unter 3.2.2.1 beschriebenen Tiere im Alter von vier bis fünf Wochen verwendet und unter der internen Nummer 402_M der Justus-Liebig-Universität Gießen als Tiere, die zu wissenschaftlichen Zwecken getötet wurden, gemeldet.

3.3.1 Etablierung der Dissoziationskultur des olfaktorischen Epithels

Um zu untersuchen, ob die Zellen des olfaktorischen Epithels der Ratte *in vitro* mit BDV infizierbar sind, wurde eine Dissoziationskultur etabliert. Dies erfolgte mit einigen Modifikationen angelehnt an verschiedene Protokolle (GRILL und PIXLEY, 1997; VARGAS und LUCERO, 1999b; BRAUCHI *et al.*, 2006). Ein besonderes Augenmerk sollte hierbei auf die Praktikabilität der Durchführung und die Eignung dieser Methode als Ersatz für einen Tierversuch gelegt werden.

3.3.1.1 Beschichtung der Deckgläschen

Für die Dissoziationskultur des olfaktorischen Epithels wurden Deckgläschen (20x20 mm, Carl Roth) zunächst für 5 h im Heißluftsterilisator sterilisiert und anschließend mit Poly-L-Lysin (Molekulargewicht 30.000 - 70.000; Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) beschichtet. Die beschichteten Deckgläschen wurden in der Sterilwerkbank mit einer feinen, sterilen Pinzette einzeln in sterile Kunststoff-Zellkulturschale mit einem Durchmesser von 3,5 cm (Greiner Bio-One, Frickenhausen) gelegt. Die Beschichtung erfolgte in Anlehnung an das von Ahlemeyer *et al.* etablierte Protokoll (AHLEMEYER und BAUMGART-VOGT, 2005).

1. Poly-L-Lysin in 1,25 % Borsäure (Sigma-Aldrich) und 1,91 % Natriumtetraborat (Carl Roth) in einer finalen Konzentration von 0,1 mg/ml lösen (Verhältnis der Lösungen 1:1).
2. Lösung mit einer 20 ml Spritze aufnehmen und mit einem Sterilfilter (0,22 µm; Rotilabo®-Spritzenfilter, Carl Roth) direkt in die vorbereiteten Petrischalen geben (2 ml pro Petrischale).
3. Inkubation der geschlossenen Petrischalen in der Sterilwerkbank bei Raumtemperatur über Nacht.
4. Poly-L-Lysin abnehmen und Petrischalen 3 x für 5 min mit sterilem Aqua dest. waschen.
5. Petrischalen geschlossen für 5 h in der Sterilwerkbank belassen.
6. Waschen der Petrischalen 3 x für 5 min mit sterilem Aqua dest.
7. Wasser vollständig abnehmen, Petrischalen mit Deckgläschen trocknen lassen.

Die Deckgläschen in den Petrischalen wurden bei Raumtemperatur gelagert und waren bis zu vier Wochen verwendbar.

3.3.1.2 Kulturbedingungen

Die Kulturen wurden im Brutschrank bei 37 °C in einer 5%igen CO₂-Atmosphäre mit hoher Luftfeuchte inkubiert. Als Kulturmedium wurde Neurobasal®A-Medium (Gibco), welches nach Herstellerangaben mit B-27® Supplement (Gibco) angereichert wurde, verwendet. Für die initiale Aussaat der Zellen wurde außerdem GlutaMAX™ Supplement (Gibco) nach Herstellerangaben zugesetzt. Außerdem wurde das Medium mit 1 % Penicillin/Streptomycin sowie 0,1 % Gentamicin (beides Gibco) supplementiert. Das angesetzte Medium wurde höchstens 14 Tage lang verwendet. Der Wechsel des Kulturmediums erfolgte jeden zweiten Tag, wobei stets eine kleine Restmenge des alten Mediums in der Kulturschale belassen wurde. Insgesamt betrug das Volumen des Kulturmediums ca. 2 ml.

3.3.1.3. Präparation der Dissoziationskultur

In zahlreichen Vorversuchen wurden verschiedene Enzyme und Enzymkombinationen, verschiedene Protokolle für den Gewebeverdau sowie verschiedene Beschichtungen der Deckgläschen getestet (GRILL und PIXLEY, 1997; VARGAS und LUCERO, 1999b; AHLEMEYER und BAUMGART-VOGT, 2005; BRAUCHI *et al.*, 2006). Die beste Zellausbeute und die beste Zellmorphologie nach längerer Kulturdauer konnte mit einer Enzymmischung erreicht werden. Pro ml der Enzymlösung wurden folgende Komponenten (alle Sigma-Aldrich) frisch in DMEM eingewogen:

- a) Collagenase: 1 mg/ml
- b) Dispase II: 2,4 U/ml
- c) DNase II: 50 µg/ml

In der Regel reichte die aus einer Ratte gewonnene Zellzahl für die Aussaat auf 3 Deckgläschen aus. Pro Ratte wurden für den Enzymverdau 6 ml dieser Lösung in DMEM frisch angesetzt, mit einem Sterilfilter für Spritzen mit einer Porengröße von 0,22 µm filtriert (Rotilabo®-Spritzenfilter, Carl Roth) und bis zum Gebrauch im Wasserbad bei 37 °C gelagert. Die Ratten wurden mit CO₂ betäubt und per Dekapitation getötet. Das Fell wurde mit 70 % Ethanol desinfiziert und der Kopf anschließend enthäutet. Die Nase wurde wenige Millimeter paramedian der Sagittalen mit einer sterilen Allzweck-Bügelsäge eröffnet. Mit sterilem Präparierbesteck wurden die Conchen sowie das caudale Drittel des Nasenseptums aus dem Cavum nasi herausgelöst und bis zur weiteren Verwendung in DMEM gelagert. Die Gewebestücke einer Ratte wurden in die Enzymlösung in einem 13 ml Kunststoff-Reaktionsgefäß mit rundem Boden (Sarstedt) mit einer abgeflamten Glas-Pasteurpipette transferiert. Die Inkubation erfolgte in einer Heizkammer mit Rüttler (Innova™2000 Platform Shaker, New Brunswick Scientific, Enfield, USA) bei 37 °C und bei 80 rpm nach folgendem Protokoll:

1. Inkubation der Reaktionsgefäße auf dem Rüttler in der Heizkammer 3 x für 15 min, nach 15 min die Röhrchen jeweils 5 x schwenken.
2. Inkubation für 10 min auf dem Rüttler in der Heizkammer.
3. Inkubation für 5 min in der Heizkammer. Rüttler dabei ausschalten damit Gewebstückchen und bereits gelöste Zellen absinken können.
4. Enzymlösung abpipettieren.
5. Gewebe mit 5 ml DMEM spülen, dazu Inkubation für 2 min auf dem Rüttler in der Heizkammer.
6. Zellen in der Heizkammer 3 min absinken lassen, danach Medium abpipettieren und 2 ml Neurobasal®-A Medium zugeben.
7. Gemisch aus Medium und Gewebe mit abgeflamter Glas-Pasteurpipette triturieren (ca. 50 x auf- und abpipettieren).
8. Überstand in neues 15 ml Röhrchen mit konischem Boden (Sarstedt) geben, Knochen- und Knorpelreste verbleiben in altem Röhrchen und werden verworfen.
9. In der Heizkammer Zellen 5 min absinken lassen.
10. Überstand über Zellpellet absaugen, mit 600 µl frischen Kulturmedium resuspendieren.
11. Zellen mit Neubauer-Zählkammer zählen.
12. Aussaat von ca. 250000 Zellen pro Deckgläschen (4 cm²).

13. Inkubation der Zellen für 20 min im Wärmeschrank, damit Zellen absinken und anheften können.
14. Kulturmedium auf ca. 2 ml auffüllen.

3.3.2 Charakterisierung der Dissoziationskultur

3.3.2.1 Reaktionsbedingungen der Immunfluoreszenz

Zunächst wurden verschiedene Antiseren zur Markierung zellulärer Komponenten der primären Dissoziationskultur des olfaktorischen Epithels getestet. Die verwendeten primären Antikörper, deren Verdünnung sowie Angaben über eine erforderliche Permeabilisierung und das Blocken sind in Tab. 13 gelistet. Die zur Detektion verwendeten und mit einem Fluoreszenzfarbstoff gekoppelten Sekundärantikörper sowie 4',6-Diamidino-2-phenylindol (DAPI, Carl Roth), das zur Kernfärbung genutzt wurde, sind in Tab. 14 aufgeführt. Zum Blocken der unspezifischen Bindungsstellen wurde für alle Antiseren Ziegen Serum (PAA Laboratories GmbH) verwendet, da die ausgewählten fluoreszenzmarkierten Sekundärantikörper aus der Ziege stammten. Zur Auswertung der Immunfluoreszenz wurde das Fluoreszenz-Mikroskop Nikon Eclipse 80i zusammen mit der Software NIS Elements BR 3.2 genutzt. Absorption und Emission der verwendeten Filter sind in Tab. 14 aufgeführt.

Tab. 13: Übersicht über die in der Immunfluoreszenz verwendeten Primärantikörper

Primärantikörper	Klonalität	Verdünnung	Blocken
Bezugsquelle	Spezifität		Permeabilisierung
Kaninchen anti neuronales Klasse III β -Tubulin (TUJ1) Covance, Princeton, USA	Monoklonal Mikrotubuli des Rattenhirns Clone TUJ1 1-15-79	1:1000 in TBS + 3 % BSA + 5 % ZS	TBS + 5 % ZS + 3 % BSA + 0,25 % Triton® X-100, 20 min (gleichzeitig)
Kaninchen anti-gliale fibrilläre acidic protein (GFAP) Dako	Polyklonal GFAP isoliert aus dem bovinen Rückenmark	1:50 in TBS + 1 % BSA	5 % ZS in TBS, 30 min 0,1 % Triton® X-100, 15 min
Maus anti-Vimentin Dako	Monoklonal Vimentin isoliert aus der porcinen Linse (Auge)	1:50 in TBS + 1 % BSA	5 % ZS in TBS, 30 min 0,1 % Triton® X-100, 15 min

TBS: *tris buffered saline*; BSA: bovin Serumalbumin; ZS: Ziegen Serum

Tab. 14: Übersicht über die verwendeten Sekundärantikörper, DAPI und die Fluoreszenzfilter

Sekundärantikörper	Fluoreszenzfarbstoff	Bezeichnung Filter	Absorption
Bezugsquelle	Verdünnung		Emission
Cy2 Ziege anti-Kaninchen Jackson ImmunoResearch	Cyanin 2 1:100	FITC (Fluoresceinisothio- cyanat)	465-495 515-555
Cy3 Ziege anti-Kaninchen Jackson ImmunoResearch	Cyanin 3 1:100	TxRed (Texas Red)	540-580 600-660
- Carl Roth	DAPI 1:500	DAPI (4',6-Diamidino-2- phenylindol)	340-380 435-485

Wenn nicht anders angegeben, wurden alle Arbeitsschritte bei Raumtemperatur durchgeführt. Die Zellen wurden mit 4 % PFA (siehe 8.1.2) in Neurobasal®-A Medium (Gibco) für 5 min fixiert. Hierzu wurde das Kulturmedium abgenommen und das Deckgläschen in der Petrischale für 5 min mit auf 37 °C erwärmter PBS-Lösung (siehe 8.1.3) gespült. Die Inkubation der Deckgläschen mit den Antiseren erfolgte in den Deckeln der Petrischalen. Dazu wurde ein zurechtgeschnittenes Stückchen Parafilm® M Verschlussfolie (Brand, Wertheim) in den Deckel gelegt. Hierauf wurde der entsprechende Antikörper gegeben. Das Deckgläschen wurde mit einer feinen Pinzette aus der Petrischale herausgehoben und mit der mit Zellen bewachsenen Seite auf den Parafilmstreifen gegeben. Für die Waschschrte wurden die Deckgläschen wieder auf den Schalenboden gelegt und vorsichtig mit der Spüllösung (TBS, siehe 8.1.2) aus einer Spritzflasche beträufelt. Ab dem Zeitpunkt des Auftragens des Sekundärantikörpers, erfolgten die Arbeitsschritte unter Vermeidung von Tageslicht.

3.3.2.2 Indirekte Immunfluoreszenz zur Darstellung der olfaktorischen Neurone

Die Immuncytochemie wurde nach folgendem Protokoll durchgeführt, das auf dem von Ziege (ZIEGE *et al.*, 2013) etablierten Protokoll basiert und für die oben beschriebenen Kulturbedingungen modifiziert wurde. Der Primär- und der Sekundärantikörper wurden mit TBS, dem 3 % BSA und 0,25 % Triton® X-100 (Serva) zugesetzt wurde, verdünnt (Tab. 13, Tab. 14).

1. Waschen der Deckgläschen in den Zellkulturschalen 2 x für 5 min mit TBS.
2. Permeabilisierung der Zellen und gleichzeitiges Blocken der unspezifischen Bindungsstellen mit 5 % Ziegen Serum, 3 % BSA und 0,25 % Triton® X-100 gelöst in TBS für 20 min.
3. Abpipettieren der Flüssigkeit.
4. Auftragen des Klasse III β -Tubulin-Antikörpers in der Verdünnung 1:1000 oder der TBS-Kontrolle auf den Parafilmstreifen und Aufbringen des Deckgläschen.
5. Inkubation der Deckgläschen über Nacht bei 4 °C in einer feuchten Kammer.
6. Waschen des Deckgläschens 3 x für 5 min mit TBS.
7. Auftragen des Sekundärantikörpers in der Verdünnung 1:100 und Inkubation für 1 h in einer dunklen, feuchten Kammer.
8. Waschen des Deckgläschens 3 x für 5 min mit TBS.
9. Auftragen des 1:500 in TBS verdünnten DAPI und Inkubation für 10 min in einer dunklen, feuchten Kammer.
10. Waschen des Deckgläschens 2 x für 5 min mit TBS.
11. Waschen des Deckgläschens für 5 min mit Aqua dest. zur Entfernung von Salzresten.
12. Deckgläschen vollständig trocknen lassen.
13. Aufbringen der Deckgläschen auf Objektträger und Eindeckeln mit Entellan in Toluol (Merck).

3.3.2.3 Indirekte Immunfluoreszenz zur Darstellung nicht-neuronaler Zellen

Zur Darstellung der olfaktorischen Hüllzellen in der Kultur wurde der polyklonale GFAP-Antikörper verwendet. Als Sekundärantikörper wurde der Cy2-markierte Ziege anti-Kaninchen-Antikörper genutzt. Die Fibroblasten der Kultur wurden mit einem Maus anti-Vimentin Antikörper und dem Cy3-markierten Ziege anti-Maus-Sekundärantikörper dargestellt. Die Immunfluoreszenz erfolgte entsprechend des unten beschriebenen Protokolls, in Anlehnung an die Protokolle der Firma Abcam plc.

1. Waschen der Deckgläschen in den Zellkulturschalen 2 x für 5 min mit TBS.
2. Permeabilisierung der Zellen mit 0,1 % Triton® X-100, gelöst in TBS für 15 min.
3. Waschen der Deckgläschen in den Zellkulturschalen 3 x für 5 min mit TBS.
4. Blocken der unspezifischen Bindungsstellen mit 5 % Ziegen Serum in TBS für 30 min.
5. Auftragen des primären Antiserums oder der TBS-Kontrolle in der entsprechenden Verdünnung auf den Parafilmstreifen und Aufbringen des Deckgläschens.
6. Weiter, wie in den Schritten 5. bis 13. unter 3.3.2.2 beschrieben.

3.3.2.4 Quantifizierung ausgewählter zellulärer Komponenten

Zur Bestimmung des Anteils der olfaktorischen Neurone an der Gesamtzellzahl in der primären Kultur wurde die Kultur zu den Zeitpunkten 4 h, 24 h, 2 d, 4 d und 7 d nach der Präparation wie unter 3.3.2.1 aufgeführt fixiert. Anschließend wurde die unter 3.3.2.2 beschriebene Immunfluoreszenz durchgeführt und die mittels des Klasse III β -Tubulin-Antikörpers markierten olfaktorischen Neurone gezählt. Als Neurone wurden alle Zellen gezählt, die einzeln oder in Gruppen lagen, einen mit DAPI-markierten blauen, runden Zellkern aufwiesen und leuchtend grüne Zellfortsätze besaßen. Die Morphologie der Neurone entsprach der Morphologie der olfaktorischen Neurone in anderen Studien (PIXLEY, 1996; CHEN *et al.*, 2008). Zusätzlich wurden die anhand ihrer Morphologie identifizierbaren olfaktorischen Hüllzellen gezählt. Sie wurden aufgrund ihres spindelförmigen Zellkörpers, der schemenhaft durch eine leichte dunkelgrüne Anfärbung des Zytoplasmas erkannt werden konnte, sowie des ovalen Zellkerns identifiziert. Die Morphologie dieses Zelltyps wurde zuvor mittels einer GFAP-Immunfluoreszenz (siehe 3.3.2.3) bestätigt und entsprach ebenfalls derer aus anderen Veröffentlichungen (OMAR *et al.*, 2013; ZIEGE *et al.*, 2013).

3.3.2.5 Auswertung

Zur Bestimmung ausgewählter Komponenten der Dissoziationskultur des olfaktorischen Epithels wurden pro Deckgläschen so viele Gesichtsfelder in der 200x-Vergrößerung gezählt, bis mindestens 200 Zellen zur Beurteilung vorlagen. Pro Untersuchungszeitpunkt wurden 3 Deckgläschen ausgezählt, sodass insgesamt mindestens 600 Zellen zur Auswertung vorlagen. Dieser Versuch wurde insgesamt 3 Mal wiederholt, wobei jedes Mal eine neue Präparation ausgewertet wurde. So konnte auch die Reproduzierbarkeit der ausgewählten Präparationsmethode getestet werden.

3.3.4 BDV-Infektion der Dissoziationskultur

3.3.4.1 BDV-Infektion

Zur Infektion der Dissoziationskultur wurde die unter 3.2.1.5 beschriebene Virussuspension verwendet. Das Kulturmedium wurde hierzu abgenommen und die Zellen wurden mit 2 ml der 1:100 in Kulturmedium verdünnten Virussuspension überschichtet und 1 h bei 37 °C im Wärmeschrank inkubiert. Anschließend wurde die Virussuspension abgenommen und die Zellen wurden für 5 min mit vorgewärmten Kulturmedium gespült. Danach wurden die Zellen

wieder mit 2 ml Kulturmedium überschichtet. Die Kulturbedingungen entsprachen denen der nicht-infizierten Ansätze (siehe 3.3.1.2).

3.3.4.2 Indirekte Immunfluoreszenz (IF) zum Nachweis von BDV-N

Zur Darstellung von BDV-N wurde eine IF mit dem monoklonalen Antikörper Bo18 (3.2.4.1) analog zu dem Protokoll unter 3.3.2.3 durchgeführt. Der Primärantikörper wurde 1:100 in TBS mit 1 % BSA verdünnt. Als Sekundärantikörper diente der Cy3-gekoppelter Antikörper in der Verdünnung 1:100. Zur Kernfärbung wurde auch hier auf DAPI zurückgegriffen.

3.3.4.3 Auswertung der BDV-Infektion

Die infizierten Zellen wurden zu den Zeitpunkten 4, 7, 10 und 14 dpi mit 4 % PFA in Neurobasal®-A Medium bei Raumtemperatur fixiert. Zuvor wurde, wie bei der nicht-infizierten Zellkultur auch, das Kulturmedium abgenommen und das Deckgläschen mit 37 °C warmer PBS-Lösung gespült. Pro Zeitpunkt wurden hier auf drei Deckgläschen jeweils mindestens 200 Zellen ausgezählt, sodass insgesamt 600 Zellen pro Zeitpunkt ausgewertet wurden. Die Infektionskinetik wurde insgesamt drei Mal durchgeführt, dabei wurden jeweils verschiedene Präparationsansätze für die Infektion verwendet. Als infiziert wurden die Zellen bewertet, die ein oder mehrere intranukleäre Granula mit roter Fluoreszenz aufwiesen. Gleichzeitig zeigten diese Zellen oft auch eine diffuse leuchtend rote Anfärbung des Zytoplasmas. Als Negativkontrollen wurden bei jeder Präparation ein oder zwei nicht infizierte Ansätze auf die gleiche Weise untersucht.

3.3.4.4 Doppelmarkierung zum Nachweis von β III-Tubulin und BDV-N

Bei den frühen Infektionszeitpunkten 4 und 7 dpi wurde bei ausgewählten Proben eine Doppelmarkierung zur simultanen Visualisierung der mit β III-Tubulin markierten olfaktorischen Neurone und BDV-N durchgeführt. Es wurde entsprechend des folgenden Protokolls, basierend auf dem für die Immunfluoreszenz der olfaktorischen Neurone angewendetem Protokoll (siehe 3.3.2.2), vorgegangen und für die simultane Inkubation mit zwei primären Antisera entsprechend der von der Firma Abcam plc empfohlenen Vorgehensweise modifiziert.

1. Waschen der Deckgläschen in den Zellkulturschalen 2 x für 5 min mit TBS.
2. Permeabilisierung der Zellen und Blocken der unspezifischen Bindungsstellen mit 5 % Ziegen Serum und 3 % BSA gelöst in TBS für 20 min.
3. Abpipettieren der Flüssigkeit.

4. Mischen des Klasse III β -Tubulin- und des Bo18-Antikörpers in den entsprechenden Verdünnung in TBS mit 3 % BSA und 0,25 % Triton® X-100. Auftragen des Gemischs oder der TBS-Kontrolle auf den Parafilmstreifen und Aufbringen des Deckgläschen.
5. Inkubation der Deckgläschen über Nacht bei 4 °C in einer feuchten Kammer.
6. Waschen des Deckgläschens 3 x für 5 min mit TBS.
7. Mischen der Sekundärintikörper Cy2 Ziege anti-Kaninchen und Cy3 Ziege anti-Maus in der entsprechenden Verdünnung in TBS mit 3 % BSA und 0,25 % Triton® X-100. Auftragen des Gemisches auf den Parafilmstreifen und Aufbringen des Deckgläschen.
8. Weiter entsprechend der Schritte 8. bis 13. wie unter 3.3.2.2 beschrieben.

3.4 ORGANOTYPISCHEN GEWEBEKULTUR DES OLFAKTORISCHEN EPITHEL

3.4.1 Etablierung der organotypischen Gewebekultur

Die organotypische Gewebekultur wurde etabliert, um die Infektion mit dem BDV in einem *In-vitro*-System zu untersuchen, das den natürlichen Gegebenheiten sehr nahe kommt. So kann sich das Virus in einem Gewebe ausbreiten und die natürliche Infektion am besten widerspiegeln. Als Grundlage dienten verschiedene Protokolle, die in Vorversuchen modifiziert wurden (GONG *et al.*, 1996; KANAKI *et al.*, 2000; GOETZE *et al.*, 2002; MARKOPOULOS *et al.*, 2008; IMBSCHWEILER *et al.*, 2012). Es zeigte sich, dass der Gewebeerhalt am zufriedenstellendsten war, wenn *Cell culture inserts* (EMD Millipore) in Kunststoff-Petrischalen (Greiner Bio-One) verwendet wurden. Außerdem wurde eine verbesserte Morphologie und eine einfachere Orientierung des Gewebes bei der histologischen Aufarbeitung ermöglicht, wenn Knochen- und Knorpelreste am Weichgewebe belassen und nicht abgezogen wurden.

3.4.1.1 Kulturbedingungen

Die Kulturen wurden im Brutschrank bei 37 °C in einer 5%igen CO₂-Atmosphäre mit hoher Luftfeuchte inkubiert. Als Kulturmedium wurde, wie auch bei der Dissoziationskultur des olfaktorischen Epithels, Neurbasalmedium-A® Medium verwendet. Dieses wurde nach Herstellerangaben mit B-27®-Supplement angereichert (beides Gibco). Außerdem wurde das Medium mit 1 % Penicillin/Streptomycin sowie 0,1 % Gentamicin (beides Gibco) versetzt. Das angesetzte Medium wurde höchstens 14 Tage lang verwendet. Der Wechsel des Kulturmediums erfolgte jeden Tag. 1,1 ml des Mediums wurden hierfür in den Spalt zwischen *Cell culture insert* und Petrischale gegeben, sodass an die Membran angehaftete Gewebestücke nicht losgelöst werden konnten.

3.4.1.2 Präparation

Zur Vorbereitung wurden die *Cell culture inserts* in Petrischalen mit einem Durchmesser von 3,5 cm gegeben. Die Membran wurde mit einem Tropfen Kulturmedium benetzt, 1 ml des Mediums wurde in den Spalt zwischen Petrischale und *Cell culture insert* gegeben. Diese Kulturgefäße wurden bis zum Gebrauch im Zellkultur-Brutschrank gelagert. Die Ratten wurden wie unter 3.2.1.4 und 3.2.2.6 beschrieben euthanasiert, dekapitiert, enthäutet und das olfaktorische Epithel wurde gewonnen. Anschließend wurde das Gewebe mit auf 37 °C erwärmten Kulturmedium gespült. Unter einem binokularen Mikrosko (Carl Zeiss, Jena) wurde mit einer feinen, gebogenen Pinzette und einer feinen Schere die Conchen samt knöcherner und knorpeliger Unterlage, sowie das caudale Drittel des Nasenseptums herauspräpariert und mit einer sterilen Skalpellklinge zerteilt. Die Gewebestücke wurden auf die Membran des *Cell culture inserts* verbracht ohne die Membran zu berühren.

3.4.2 BDV-Infektion der organotypischen Gewebekultur

3.4.2.1 Infektion

Zur Infektion der organotypischen Gewebekultur wurde die unter 3.2.1.5 beschriebene Virussuspension verwendet. In Vorversuchen wurde ein geeignetes Protokoll für die Infektion mit dem BDV erarbeitet. Die Virussuspension wurde wie bei der Infektion der Dissoziationskultur (siehe 3.3.4.1) 1:100 mit dem Kulturmedium verdünnt und mit den Gewebestücke für 1 h bei 37 °C inkubiert. Hierzu wurde das Kulturmedium abgenommen und 2 ml der verdünnten Virussuspension langsam auf die sich auf der Membran befindlichen Gewebeprobe aufgeträufelt und in den Spalt zwischen Petrischalenrand und *Cell culture insert* eingegeben. Anschließend wurde die Virussuspension abpipettiert und die Gewebeprobe für 5 min mit 2 ml des Kulturmedium gespült. Zuletzt wurden 1,1 ml des Mediums, wie unter 3.4.1.1 beschrieben, zugegeben.

3.4.2.2. Immunhistologischer Nachweis von BDV-N

Die Proben der organotypischen Gewebekultur wurden nach den Zeitpunkten 4, 7, 10 und 14 dpi mit 4 % PFA (siehe 8.1.3) für 30 min bei Raumtemperatur fixiert und der Paraffin-Routineeinbettung zugeführt. Waren noch deutliche Knochenanteile in den Gewebestücken vorhanden, wurde das Gewebe für 24 Stunden mit EDTA (siehe 8.1.1) entkalkt. Vor dem Einbettprozess wurde das Gewebe über Nacht in Leitungswasser gewässert. Die weitere Aufarbeitung der Gewebeprobe und die Durchführung der Immunhistologie zum Nachweis von BDV-N erfolgte wie unter 3.2.3.1 und 3.2.4.1 beschrieben.

3.4.2.3 *In-situ-Hybridisierung zum Nachweis viraler RNA*

Nach der Fixierung und routinemäßigen Einbettung (3.4.2.2) erfolgte die ISH entsprechend des unter 3.2.5.2 beschriebenen Vorgehens. Untersucht wurden hierbei die Zeitpunkte 4, 7, 10 und 14 Tage nach der Infektion.

3.5 CO-KULTUR AUS OLFAKTORISCHEM EPITHEL UND OLFAKTORISCHEN HÜLLZELLEN

Die Kultur der caninen olfaktorischen Hüllzellen (*olfactory ensheathing cells*, OECs) wurde freundlicherweise von Herrn Professor Wewetzer, Institut für Funktionelle und Angewandte Anatomie, Medizinische Hochschule Hannover und Herrn Professor Baumgärtner, Institut für Pathologie, Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover, zur Verfügung gestellt. Die Kulturbedingungen und Arbeitsschritte wie das Passagieren wurden bereits von Ziege *et al.* (ZIEGE *et al.*, 2013) etabliert.

3.5.1 Kulturbedingungen der OECs

Angelehnt an die Kulturbedingungen von Ziege *et al.* (ZIEGE *et al.*, 2013) wurden die Zellen in 25 cm² Kulturflaschen (Sarstedt) bei 37 °C und einer 5 % CO₂-Atmosphäre im feuchten Wärmeschrank kultiviert. Als Kulturmedium wurden 5 ml DMEM (*high glucose*, Gibco) verwendet und mit 10 % FCS (*fetal calf serum*), sowie mit 5 % Penicillin/Streptomycin (Gibco) supplementiert. Der Mediumwechsel erfolgte alle 2-3 Tage, eine Passagierung der Zellen erfolgte wöchentlich.

3.5.1.1 Beschichtung der Zellkulturflaschen

Um eine bessere Anheftung der Zellen zu gewährleisten, wurden 25 cm² Kulturflaschen (Sarstedt) mit Poly-L-Lysin (Molekulargewicht 70.000 - 150.000, Sigma-Aldrich) in der Konzentration 0,1 mg/ml gelöst in sterilem Aqua dest. beschichtet. Dazu wurden 2 ml dieser Lösung in die Flaschen gegeben und über Nacht im Wärmeschrank bei 37 °C inkubiert. Die Lösung wurde abpipettiert, die Flaschen 3 x für 5 min mit sterilem destilliertem Wasser gespült und in der Sterilwerkbank bis zur vollständigen Trocknung aufbewahrt. Die Lagerung erfolgte bis zum Gebrauch bei Raumtemperatur.

3.5.2 BDV-Infektion der OECs

3.5.2.1 BDV-Infektion

Um zu testen, ob die OECs mit dem rattenadaptierten BDV (siehe 3.2.1.5) infizierbar sind, wurden die Zellen in einer Dichte von 250000 Zellen pro 4 cm² Kulturfläche auf Deckgläschen ausgesät. Die Infektion wurde einen Tag nach der Aussaat entsprechend des unter 3.3.4.1 beschriebenen Protokolls durchgeführt. Anstelle des dort beschriebenen Kulturmediums wurde hier die Virussuspension mit DMEM (Gibco) 1:100 verdünnt. Ausgesät wurden in diesem Versuch Zellen der Passagen 5 und 6 nach dem Auftauen. 6 Tage nach der Infektion wurden die Zellen für 5 min bei Raumtemperatur mit 4 % PFA (siehe 8.1.2) fixiert. Zuvor wurde das Kulturmedium abgenommen und die Zellen wurden für 5 min mit warmer PBS-Lösung gewaschen. Nach dem Fixieren wurden die Zellen in den Petrischalen mit kaltem PBS überschichtet und bei 4 °C im Kühlschrank bis zur weiteren Verwendung gelagert.

3.5.2.2 Indirekte Immunfluoreszenz zum Nachweis von BDV-N

Der Nachweis der BDV-Infektion erfolgte analog zu dem unter 3.3.4.2 beschriebenen Verfahren mittels indirekter Immunfluoreszenz.

3.5.2.3 Auswertung

Die Auswertung erfolgte 6 Tage nach der Infektion, da aus der Kultur des olfaktorischen Epithels der Ratte bekannt war, dass zu diesem Zeitpunkt bereits eine sicher identifizierbare intranukleäre Kernreaktion in den OECs zu finden war. Zur Bewertung wurden für die Passage 5 und 6 je rund 300 Zellen auf 5 Deckgläschen ausgezählt. Als infizierte Zellen wurden diejenigen gezählt, die ein oder mehrere intranukleäre Granula mit roter Fluoreszenz aufwiesen. Gleichzeitig zeigten diese Zellen auch eine diffuse leuchtend rote Anfärbung des Zytoplasmas. Als Negativkontrollen wurden zwei nicht infizierte Ansätze auf die gleiche Weise untersucht.

3.5.3 Co-Kultur aus olfaktorischem Epithel und OECs

Um den Einfluss der OECs auf den Verlauf einer Infektion mit dem BDV weitergehend zu untersuchen, wurde eine Co-Kultivierung der OECs mit der Dissoziationskultur des olfaktorischen Epithels durchgeführt. Da in der Mischkultur des Riechepithels bereits anteilig OECs vorhanden waren, sollte der Anteil dieses Zelltyps an der Gesamtzellzahl erhöht werden. Dabei wurden verschiedene Mengenverhältnisse von OECs und Zellen des

olfaktorischen Epithels auf einem Deckgläschen ausgesät, mit BDV infiziert und 4 sowie 7 dpi untersucht. Zum Vergleich erfolgte die Untersuchung an einer reinen Kultur der OECs und der Zellen des olfaktorischen Epithels (OE) der Ratte. Als Negativkontrollen wurden nicht-infizierte Ansätze der verschiedenen Mischverhältnisse und der Ausgangskulturen zu den verschiedenen Zeitpunkten untersucht.

3.5.3.1 Kulturbedingungen

Als Kulturmedium diente Neurobasal®-A Medium (Gibco). Der Mediumwechsel erfolgte jeden zweiten Tag, die übrigen Kulturbedingungen entsprachen den obigen (siehe 3.3.1.2). Zur Vorbereitung der Co-Kultivierung wurden die OECs an das serumfreie Kulturmedium der Zellen des olfaktorischen Epithels gewöhnt. Hierzu wurde über einen Zeitraum von einer Woche alle ein bis zwei Tage ein Mediumwechsel durchgeführt, bei dem das DMEM (Gibco), dem ursprünglich 10 % FCS zugesetzt wurde, jeweils durch 1 bis schließlich 5 ml Neurobasal®-A Medium (Gibco), supplementiert mit B-27® Supplement (Gibco), ersetzt wurde.

3.5.3.2 Präparation der Co-Kultur

Um eine Vergleichbarkeit der verschiedenen Kulturansätze zu gewährleisten, wurden auf jedes Deckgläschen von 4 cm² Kulturfläche insgesamt 250000 Zellen ausgesät. Folgende Ansätze und Mischverhältnisse wurden untersucht:

1. Reine Kultur des OE
2. Reine Kultur der OECs
3. Kultur des OE:OECs 3:1
4. Kultur des OE:OECs 1:1

Pro Ansatz wurden für die Zeitpunkte 4 und 7 dpi je drei Deckgläschen untersucht. Als nichtinfizierte Kontrolle wurde je Mischverhältnis bzw. je Kultur und Zeitpunkt ein Deckgläschen mitgeführt, um eine BDV-Kontamination während der Kultivierung und der RNA-Isolierung auszuschließen. Insgesamt wurde die Präparation zwei Mal durchgeführt.

Die Präparation und die Aussaat der Zellen des olfaktorischen Epithels erfolgten nach der unter 3.3.1.3 beschriebenen Methode und nach den oben beschriebenen Mischverhältnissen. 20 Minuten nach der Aussaat wurden 2 ml Neurobasal®-A Medium zugegeben und die Zellen in den Wärmeschrank verbracht. Am folgenden Tag erfolgte die Zugabe der OECs. Hierzu wurde das Kulturmedium abgenommen und die entsprechende Zellzahl an OECs auf das Deckgläschen gegeben. Nach einer Anheftungszeit von 20 min wurde die Petrischale mit 2 ml Kulturmedium aufgefüllt.

3.5.3.3 BDV-Infektion der Co-Kultur

Die Infektion erfolgte 4 Stunden nach der Aussaat der OECs nach der unter 3.5.2.1 beschriebenen Methode.

3.5.4 Nachweis von viraler RNA mittels quantitativer *real time* RT-PCR (qPCR)

Die Auswertung der Co-Kultur erfolgte mittels einer quantitativen *real time* RT-PCR, die von Porombka (POROMBKA, 2006) etabliert und auf Sensitivität und Spezifität getestet wurde. Die Versuchsbedingungen wurden von Kehr (KEHR, 2015, eingereicht) modifiziert. Diese Methode erlaubt eine absolute Quantifizierung und einen Vergleich der in den BDV-infizierten Kulturen vorhandenen viralen bzw. genomischen RNA und der mRNA. In der vorliegenden Arbeit wurden die Untersuchungen auf die für das BDV-N kodierenden RNA und den entsprechenden genomischen Abschnitt beschränkt.

Zur Auswertung und zur Quantifizierung der BDV-spezifischen Transkripte wurde zunächst die RNA aus der Zellkultur mit dem RNeasy Mini Kit (Qiagen) isoliert. Danach wurde der RNA-Gehalt mit dem Nanodrop 2000 Spektrophotometer (Thermo Fisher) gemessen. Das Umschreiben der RNA erfolgte in einer reversen Transkriptionsreaktion (RT-Reaktion) mittels QuantiTect® Reverse Transcription Kit (Qiagen). Abweichend von den Herstellerangaben wurde ein Schritt mit einer spezifischen Primeranlagerung eingefügt, um spezifisch genomische RNA oder mRNA nachzuweisen. Die so gewonnene cDNA wurde schließlich in die *real time* PCR eingesetzt. Folglich handelt es sich bei dieser Methode um eine *two-step*-PCR.

3.5.4.1 RNA-Isolierung

Zu den Zeitpunkten 4 und 7 Tage nach der Infektion wurde die RNA aus den Zellen isoliert. Die Durchführung entsprach dem Protokoll von Porombka (POROMBKA, 2006), das auf der Methode von Chomczynski und Sacchi (CHOMCZYNSKI und SACCHI, 1987) sowie den Herstellerangaben von Qiagen bezüglich des verwendeten RNeasy Mini Kits beruhte. Der DNA-Verdau wurde mit dem RNase-free DNase Set (Qiagen) durchgeführt.

Die RNA-Isolierung fand in einer Sterilwerkbank statt. Zur Beseitigung möglicher RNasen wurden vor Beginn Arbeitsoberflächen und -geräte zunächst mit 70%igem Ethanol desinfiziert und mit RNase away (ready to use, Carl Roth) gereinigt. Alle Arbeitsschritte erfolgten bei Raumtemperatur, sofern nicht anders angegeben. Es wurden sterile Eppendorfgefäße und sterile gestopfte Pipettenspitzen verwendet. Die Chemikalien TRIzol® Reagent (Life Technologies), Chloroform (Carl Roth) und β -Mercaptoethanol (Sigma-Aldrich)

wurden in den benötigten Mengen unter einem Abzug pipettiert. Zum Zentrifugieren der Reaktionsgefäße wurde die Eppendorf-Zentrifuge 5415C (Eppendorf, Hamburg) genutzt.

Die Isolierung erfolgte nach dem unten beschriebenen Protokoll wie folgt:

1. Abnehmen des Zellkulturmediums.
2. Waschen der Petrischalen mit auf 37 °C erwärmtem sterilen PBS.
3. Zum Aufschließen der Zellmembran 600 µl Trizol in die Petrischale geben und mit einem Zellschaber die Zellen durch mehrfaches Hin- und Herschieben vom Deckgläschen lösen.
4. Trizol mit einer 1000 µl-Pipette auf- und abpipettieren bis eine visköse Konsistenz erreicht ist.
5. Überführen der Lösung in ein 2 ml Kunststoff-Reaktionsgefäß, Inkubation für 3 min.
6. 240 µl Chloroform hinzufügen und für 15 s kräftig schütteln und anschließend für 3 min inkubieren.
7. Zentrifugieren bei 12.000x g für 15 min zur Auftrennung des Gemischs in drei Phasen:
 1. obere klare, farblose Phase mit RNA, 2. Intermediärphase mit DNA, 3. organische Phase mit DNA und Proteinen.
8. Abpipettieren der oberen Phase (ca. 300 µl) und Verbringen in ein neues 2 ml Eppendorfgefäß.
9. 335 µl Isopropanol zugeben und Gemisch bis zum Verschwinden der Schlieren auf- und abpipettieren.
10. Inkubation über Nacht bei -20 °C zum Ausfällen der RNA.
11. Zentrifugieren des Eppendorfgefäßes bei 12.000x g für 10 min zur Bildung eines RNA-Pellets.
12. Überstand abnehmen und verwerfen.
13. Spülen des RNA-Pellets mit 150 µl 70%igem Ethanol.
14. Zentrifugieren des Pellets bei 14.000x g für 10 min.
15. Abnehmen der Flüssigkeit und Pellet in der Sterilwerkbank trocknen lassen.
16. Zur Verwendung des RNeasy Mini Kits (Qiagen) das unten beschriebene Puffergemisch ansetzen. Für eine Probe werden benötigt:
 - a. 350 µl RLT-Puffer
 - b. 350 µl 70 % Ethanol zum Aktivieren der Säulchenmembran
 - c. 3,5 µl β-Mercaptoethanol (Sigma-Aldrich) zum Inaktivieren von RNasen
17. Das Pellet in 350 µl RLT-Puffer mit zuvor zugesetzten 3,5 µl β-Mercaptoethanol durch Auf- und Abpipettieren resuspendieren. Anschließend mit 350 µl 70% Ethanol vermischen.

18. 700 µl des Gemischs auf die in einem 2 ml Collection Tube befindliche SpinColumn geben.
19. Zentrifugieren bei 8.000x g für 15 s, den Durchfluss verwerfen.
20. SpinColumn wieder auf Collection Tube setzen 350 µl RW1-Puffer aus dem Kit auf die Säule geben.
21. Zentrifugieren bei 8.000x g für 15 s, den Durchfluss verwerfen und SpinColumn wieder auf das bereits verwendete Collection Tube setzen.
22. Für den DNase I-Verdau pro Probe der nach Herstellerangaben (Qiagen) angesetzten DNase I-Stammlösung mit 70 µl RDD buffer mischen, auf die Membran der Säule geben und für 15 min inkubieren.
23. 350 µl RW 1 buffer auf die Säule geben und bei 8.000x g für 15 s zentrifugieren. Anschließend das Collection Tube samt Durchfluss verwerfen.
24. Spin Column in ein neues Collection Tube setzen, 500 µl RPE-Puffer zugeben und bei 8.000x g 15 s zentrifugieren. Anschließend den Durchfluss verwerfen.
25. Schritt 24 in gleichem Collection Tube wiederholen.
26. Säule in gleiches Collection Tube setzen und bei der maximalen Zentrifugalkraft 1 min lang zum Trocknen der Säule zentrifugieren. Danach Collection Tube und Durchfluss verwerfen.
27. Säule auf 1,5 ml Collection Tube setzen, 30 µl RNase free water aus dem Kit auf Membran geben, 1 min bei 8.000x g zentrifugieren zum Herauslösen der RNA aus dem Spin Column.

Anschließend wurde die RNA-Konzentration mit dem Nanodrop 2000 Spectrophotometer (Thermo Fisher) gemessen. Als Nullwert wurde das RNase-freie Wasser aus dem Kit verwendet. Die RNA wurde bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert.

3.5.4.2 RT-Reaktion

Das Umschreiben der RNA in cDNA erfolgte nach dem Protokoll von Porombka (POROMBKA, 2006) und wurde mittels QuantiTect® Reverse Transcription Kit (Qiagen) und dem Multicycler® PTC 200 (Biozym Scientific) durchgeführt. Zusätzlich zu den Herstellerangaben beinhaltet dieses Protokoll einen Schritt, in dem jeweils spezifische Primer angelagert wurden. So wurde mit dem antisense-Primer RNA positiver Polarität (+ssRNA, mRNA) in cDNA und mit dem sense-Primer RNA negativer Polarität (-ssRNA) in cDNA umgeschrieben. Für die RT-Reaktion des *housekeeping*-Gens GAPDH (Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase) wurde nur der antisense-Primer verwendet, um so eine cDNA zu generieren, die der korrespondierenden mRNA entspricht. Die verwendeten Primer sind in Tab. 15 aufgeführt. Von Porombka *et al.* (POROMBKA *et al.*,

2008b) konnte dabei gezeigt werden, dass bei einheitlichen Reaktionsbedingungen und einer einheitlichen RNA-Ausgangsmenge eine vergleichbare Menge cDNA synthetisiert wird, auch wenn Primer mit unterschiedlicher Spezifität verwendet werden. Soweit nicht anders angegeben, wurden die Arbeitsschritte auf Eis durchgeführt. Um das Pipettieren der drei unterschiedlichen RT-Reaktionen zu erleichtern, wurde die RNA-Menge vorab mit RNase-freiem Wasser auf die gewünschte Konzentration eingestellt, sodass immer das gleiche Volumen eingesetzt werden konnte. Aufgrund des sehr niedrigen RNA-Gehalts wurde in jeder der drei RT-Reaktionen 36 ng RNA bzw. die maximal erreichbare Menge eingesetzt. Da die Proben später mit dem *housekeeping gene* GAPDH normalisiert wurden, beeinflussten diese Unterschiede nicht die Versuchsergebnisse.

Tab. 15: Übersicht über die verwendeten Primer und Sonden für die RT-Reaktion und die quantitative *real time* PCR

Primer / TaqMan®-Sonde Sequenz (5' - 3')	Konzentration (nM)	GenBank® Accession- Nummer (Länge / Position)
*BDV-N sense (p332) CGG GTA TAG GGC ATG AGA AGG ATA	200	AF158629 (96 bp / 87-428)
*BDV-N antisense (p333) CAA GGC TGG GCG TTA CTG TAT G	300	
BDV-N probe CGC CGT GAC TGG TCT AAC AAT GCC ACT	200	
GAPDH sense (p338) GGT CTA CAT GTT CCA GTA TGA CTC T	100	NM017008 (82 bp / 972-1053)
*GAPDH antisense (p339) GTT GAT GAC CAG CTT CCC ATT CT	100	
GAPDH probe CGG CAA GTT CAA CGG CAC AGT CAA GGC	100	

BDV-N: BDV-Nukleoprotein; GAPDH: Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase; p334, p335, p338, p339: interne Primerbezeichnungen; bp: Basenpaare; probe: TaqMan®-Sonde; *: Verwendung für die RT-Reaktion

Die Komponenten der RT-Reaktion und die durchgeführten Schritte sind in Tab. 16 zusammengefasst. Die Reaktion wurde entsprechend des folgenden modifizierten Protokolls durchgeführt, das auf den Herstellerangaben basiert:

1. Eliminierung genomischer DNA (gDNA)

Folgende Komponenten wurden für jede Probe in ein Kunststoff-Reaktionsgefäß pipettiert und gut durchmischt. Die Gesamtmenge für diesen Schritt des Protokolls betrug 14 µl.

2 µl gDNA Wipeout Buffer (7x)

9 µl der Template RNA in der voreingestellten Konzentration

3 µl RNase-free water

Es erfolgte eine Inkubation im Heizblock (Accublock™ Mini, Labnet International, Edison, USA) für 2 min bei 42 °C. Danach wurden die Proben sofort auf zerkleinertes Eis verbracht.

2. Anlagerung des spezifischen Primers

Dem obigen Ansatz wurde 1 µl des jeweiligen spezifischen Primers zugesetzt und das Gemisch wurde für 5 min bei 70 °C im Thermocycler (Biomed, Oberschleißheim) inkubiert. Danach wurde das Kunststoff-Reaktionsgefäß sofort wieder auf Eis verbracht.

3. Zugabe des Reverse-Transcription Master Mix für die RT-Reaktion

Zugabe des RT-Mastermix, pro Ansatz bestehend aus folgenden Komponenten:

1 µl Quantiscript Reverse Transcriptase

4 µl Quantiscript RT Buffer

Der gesamten RT-Reaktionsansatz mit einem Gesamtvolumen von 20 µl wurde gut durchmischt und im Multicycler® PTC 200 (Biozym Scientific) für 15 min bei 42 °C, anschließend für 3 min bei 95 °C inkubiert und schließlich bis zur Entnahme der Proben aus dem Gerät bei 4 °C inkubiert.

Tab. 16: Übersicht über die Komponenten und Schritte der RT-Reaktion

Komponente	Konzentration der Stammlösung	Volumen	Konzentration/Menge pro Ansatz
1. Eliminierung genomischer DNA (gDNA)			
gDNA Wipeout Buffer	7x	2 µl	1x
RNase-free water		3 µl	
Template RNA	4 ng/µl	9 µl	36 µg
2. Anlagerung des spezifischen Primers			
Spezifischer Primer	15 µM	1 µl	0,75 µM
3. Reverse-transcription master mix für die RT-Reaktion			
Quantiscript Reverse Transcriptase		1 µl	
Quantiscript RT Buffer	5x	4 µl	1x
Gesamtvolumen		20 µl	

3.5.4.3 Quantitative real time Polymerase Kettenreaktion (qPCR)

Die Reaktionsbedingungen für die qPCR entsprachen denen von Porombka (POROMBKA, 2006; POROMBKA *et al.*, 2008b) und wurden von Kehr (KEHR, 2015, eingereicht) modifiziert. In Tab. 15 sind die verwendeten Primer sowie der zugehörigen Sonden mit ihren Konzentrationsangabe aufgeführt.

Bei den Sonden handelt es sich um 5'-FAM-3'-TAMRA-markierte TaqMan®-Sonden (Eurogentec SA, Seraing, Belgien). Die qPCR wurde in dem Thermocycler Rotor-Gene® Q (Qiagen) und mit dem Rotor-Gene® Probe PCR Kit (Qiagen) durchgeführt. Die absolute Kopienzahl der Sequenzen genomischer und mRNA wurden anhand der Standardverdünnungsreihen (Herstellung der Standardverdünnungsreihen siehe unten), die bei jedem Lauf in den Mengen 10^3 bis 10^8 Kopien im Doppelsatz mitgeführt wurden, automatisch von der zugehörigen Software des Rotor-Gene® Thermocyclers berechnet. Die Kopienzahl der cDNA des *housekeeping genes* GAPDH wurde gleichzeitig für jede Probe ermittelt, um eine Normalisierung der berechneten Kopienzahlen für BDV-N durchführen zu können. Auch für die GAPDH-spezifischen Sequenzen wurde bei jedem Lauf eine Standardverdünnungsreihe mit den Kopienzahlen von 10^2 bis 10^8 Kopien im Doppelansatz mitgeführt. Aufgrund der geringen RNA-Menge nach der RNA-Isolierung musste auf die Untersuchung weiterer *housekeeping genes* verzichtet werden. In Vorarbeiten von Porombka konnte jedoch gezeigt werden, dass GAPDH die stabilste Expression bei BDV-infiziertem Gewebe zeigte (POROMBKA *et al.*, 2008b). Jede untersuchte Probe wurde als Doppelansatz in der qPCR untersucht. Von der in der RT-Reaktion umgeschriebenen cDNA wurden jeweils 3 μ l in die qPCR und 7 μ l Wasser aus dem Rotor-Gene® Probe PCR Kit (Qiagen) eingesetzt. In Tab. 17 sind die Anteile der Komponenten des Kits für den Reaktionsansatz einer Probe mit einem Volumen von 25 μ l aufgeführt. Der Reaktionsansatz I wurde für alle unbekanntes und zu untersuchenden Proben angesetzt. Der Reaktionsansatz II wurde bei den Proben der Standardverdünnungsreihen von BDV-N und GAPDH berechnet. Der Reaktionsansatz III ist eine Aufstellung der Mengen der benötigten Komponenten für die Nullkontrollen (*no template controls*) in die keine cDNA oder DNA eingesetzt wurde.

Tab. 17: Übersicht über die Reaktionsansätze der quantitativen *real time* PCR

Reagenz	Konzentration der Ausgangsreagenz	Eingesetztes Volumen
qPCR Mastermix		
2x Mastermix buffer	2x	12,5 µl
Sense primer	15 µM	entsprechend der in der Tab. 15 angegebenen Primer- und Sonden-spezifischen Endkonzentrationen
Antisense primer	15 µM	
TaqMan®-Sonde	50 µM	
Wasser		ad 15 µl
qPCR Reaktionsansatz I (für die zu untersuchenden Proben)		
qPCR Mastermix		15 µl
Wasser		7 µl
cDNA		3 µl
Gesamtvolumen		25 µl
qPCR Reaktionsansatz II (für die Proben der Standardverdünnungsreihe)		
qPCR Mastermix		15 µl
Wasser		-
DNA		10 µl
Gesamtvolumen		25 µl
qPCR Reaktionsansatz III (für die <i>no template control</i>)		
qPCR Mastermix		15 µl
Wasser		10 µl
cDNA		-
Gesamtvolumen		25 µl

Die Amplifikation der Sequenzen erfolgte nach der Aktivierung der im Kit enthaltenen HotStarTaq Plus® DNA Polymerase für 3 min bei 95 °C in 40 Zyklen. Jeder Zyklus beinhaltete einen Denaturierungsschritt, der bei 95 °C für 3 Sekunden ausgeführt und einen kombinierten Anlagerungs- und Verlängerungsschritt, der bei 60 °C für 10 Sekunden ausgeführt wurde. Die Detektion der Fluoreszenz durch den Rotor-Gene® erfolgte bei Verwendung der TaqMan®-Sonden stets während des Anlagerungs- und des Verlängerungsschrittes. Mittels der Rotor-Gene® Software 2.0.2. wurde der Ct-Wert (*threshold cycle*) automatisch bestimmt. Dieser Wert entspricht der Zykluszahl, bei dem die Fluoreszenz deutlich über dem Hintergrundwert liegt und gleichzeitig die exponentielle Phase der Amplifikation stattfindet. Je kleiner der Ct-Wert, desto höher ist das Expressionslevel der untersuchten Gensequenz.

Kontrollen für die qPCR

Die Standardverdünnungsreihen dienten sowohl als Positivkontrollen als auch *inter-run calibrators* (IRC), um Ungenauigkeiten zwischen den verschiedenen Läufen auszuschließen. Zusätzlich wurde in jedem Lauf eine *no template control* für die BDV-N und GAPDH cDNA eingesetzt. In diesen Kontrollen wurde statt der cDNA nur steriles Wasser eingesetzt.

Standardverdünnungsreihen

Für die absolute Quantifizierung und Normalisierung der BDV-N-spezifischen Sequenzen wurden die Standardverdünnungsreihen (SVRs) entsprechend des von Porombka (POROMBKA, 2006) etablierten Protokolls verwendet. Die SVRs für BDV-N und GAPDH standen aus der Arbeit von Kehr (KEHR, 2015, eingereicht) zur Verfügung. In jedem Lauf der qPCR wurde ein Doppelansatz der SVRs in den Konzentrationen von 10^2 für GAPDH bzw. 10^3 für BDV-N bis 10^8 mitgeführt. Es handelte sich hierbei um nicht-linearisierte Plasmide, die die jeweiligen Inserts enthalten (siehe Tab. 18).

Tab. 18: Verwendete Plasmide zur Herstellung der Standardverdünnungsreihen

Plasmid (Interne Identifikation)	Größe (M13R - M13F)	Referenz Acc.-No. Position
BDV-N (Plasmid III)	507 bp	AF158629 87-428
GAPDH (Plasmid II)	247 bp	NM017008 972-1053

BDV-N: BDV-Nukleoprotein; GAPDH: Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase; bp: Basenpaare; M13R: M13 reverse primer; M13F: M13 forward primer

Zur Amplifikation der Inserts wurde von Kehr (KEHR, 2015, eingereicht) das QIAGEN® Multiplex PCR Kit (Qiagen) und die HotStarTaq® DNA Polymerase zusammen mit den Primern M13 *reverse* und M13 *forward* verwendet. Die PCR wurde nach Herstellerempfehlungen und in einem Multicycler® PTC 200 (Biozym Scientific) durchgeführt. Die Amplifikatgröße wurde mittels Gelelektrophorese überprüft und der DNA-Gehalt spektralphotometrisch bestimmt. Anhand des DNA-Gehalts ließ sich die Kopienanzahl berechnen (POROMBKA, 2006) Kehr (KEHR, 2015, eingereicht) und eine Stocklösung von 10^9 DNA-Kopien/ μ l Flüssigkeit herstellen, aus der wiederum eine \log_{10} -Verdünnungsreihe aliquotiert wurde. Um Pipettierungenauigkeiten vorzubeugen, wurden jeweils 10 μ l der nächstgrößeren Verdünnungsstufe eingesetzt. Bis zur Verwendung wurden die Aliquots bei -20 °C in DNA LoBind® Reaktionsgefäßen (Eppendorf) aufbewahrt.

Absolute Quantifizierung

Die absolute Quantifizierung der Amplifikate konnte anhand der oben beschriebenen SVRs und der hieraus ermittelten Standardkurve durch die Software berechnet werden.

Normalisierung

Die Normalisierung der absoluten Kopienzahlen wurden in Anlehnung an die von Porombka (POROMBKA, 2006) verwendete Methode durchgeführt. Im vorliegenden Fall musste das Berechnen eines Normalisierungsfaktors aus verschiedenen *housekeeping genes* in

Anlehnung an die von Vandesompele *et al.* (VANDESOMPELE *et al.*, 2002) beschriebene Methode entfallen, da aufgrund sehr geringer Ausgangsmengen aus der RNA-Isolierung die zu untersuchenden *genes of interest* nur mit GAPDH verglichen werden konnte. Die *genes of interest* (GOI) wurden standardisiert, indem die vom Programm des berechnete Kopienzahl für jede Probe durch die errechnete Kopienzahl des *housekeeping genes* GAPDH dividiert wurde. Anschließend wurde der geometrische Mittelwert aus den Doppelansätzen der 3 Deckgläschen in den 2 Wiederholungen berechnet.

Entgegen der Beobachtungen aus Vorversuchen ergaben sich bei der Auswertung der Proben Unterschiede in der GAPDH-Expression zwischen den 4 Ansätzen, die auf speziesspezifische Unterschiede in den GAPDH-Sequenzen von Ratte und Hund zurückzuführen waren. Folglich konnten diese Ansätze nicht miteinander verglichen werden. Deshalb wurde ein Quotient aus den normalisierten Kopienzahlen für die amplifizierte virale genomische und mRNA gebildet. Die so ermittelten relativen Werte konnten ohne Verfälschungen zwischen den 4 Ansätzen verglichen werden. Zusätzlich wurde der Verlauf dieses Quotienten nach 4 und nach 7 Tagen untersucht und beurteilt.

Die Negativkontrollen dienten der Überprüfung der Spezifität der PCR und wurden nicht in die Auswertung mit einbezogen.

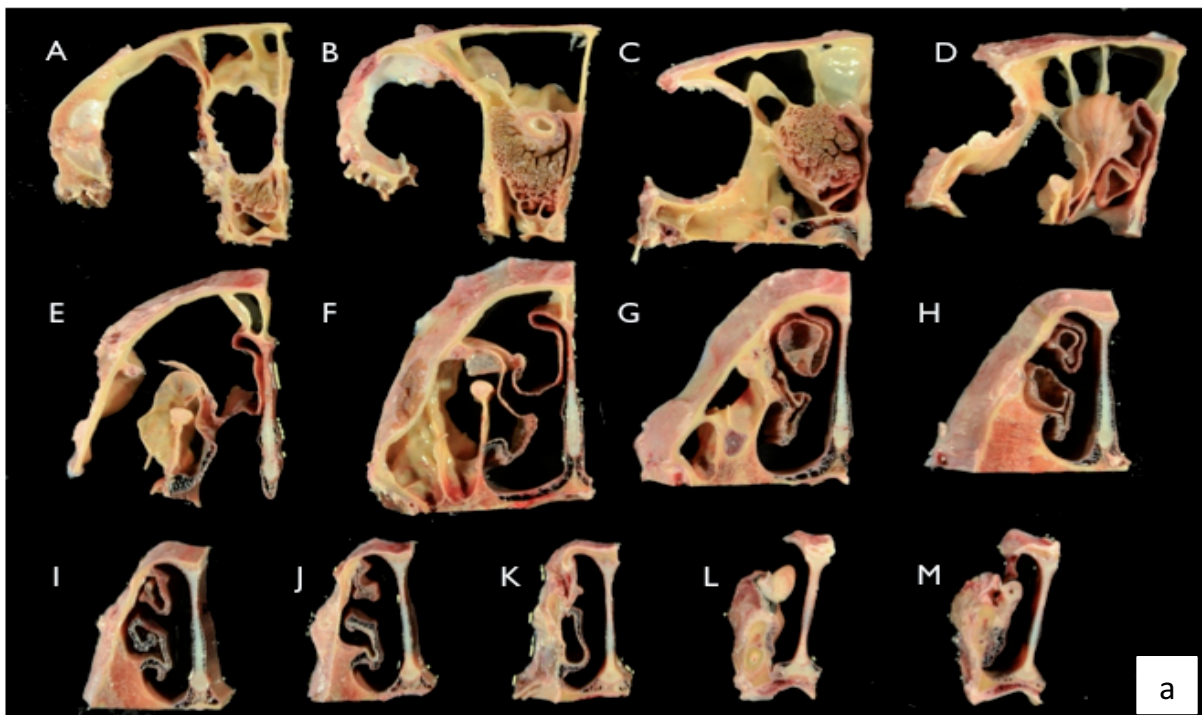
4. ERGEBNISSE

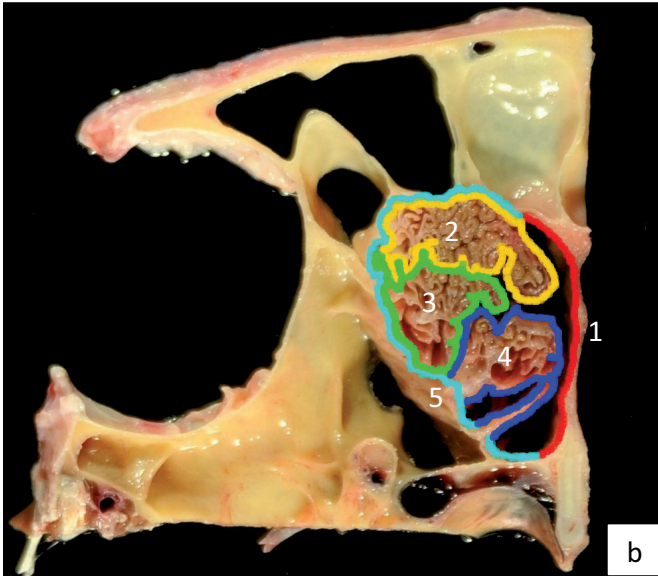
4.1 CHARAKTERISIERUNG DES OLFAKTORISCHEN EPITHELDES DES PFERDES

4.1.1 Lokalisation des olfaktorischen Epithels in der Pferdenase

Die Bereiche des olfaktorischen Epithels innerhalb der Pferdenase wurden anhand H&E-gefärbter Gewebeschnitte bestimmt und der prozentuale Anteil des olfaktorischen Epithels bzw. der verschiedenen Typen abgeschätzt. Die untersuchten Gewebeanteile entsprachen repräsentativen Bereichen der 13 frontal gesägten Querschnitte in der Pferdenase, bezeichnet von caudal nach rostral mit A - M (Abb. 6a). Jeder dieser 13 Querschnitte wurde unterteilt in die Lokalisationen Nasenseptum (Lokalisation 1), 3 Lokalisationen der Nasenmuscheln (von dorsal nach ventral Lokalisationen 2 - 4) und äußerer Begrenzung des Cavum nasi (Lokalisation 5; Abb. 6b).

Abb. 6a: Frontale Schnitte durch die Pferdenase, beginnend mit den caudalsten Anteilen des Siebbeins (A) und endend im Bereich der Nasenöffnungen (M); b: Untersuchte Lokalisationen der Nasenquerschnitte





Querschnitt C; 1: Nasenseptum (rot), 2: dorsaler Bereich Nasenmuscheln (gelb), 3: mittlerer Bereich Nasenmuscheln (grün), ventraler Bereich Nasenmuscheln (blau), 5: Begrenzung der Nasenhöhle (türkis)

Olfaktorisches Epithel konnte histologisch im H&E-gefärbtem Schnitt bei 3 von 5 Pferden in den Querschnitten A - D auf allen Anteilen der Nasenmuscheln gefunden werden. Bei 2 Pferden war das Riechepithel nur in den Querschnitten A - C vertreten. Auf der Lamina perpendicularis, die rostral in das Nasenseptum übergeht, war im Querschnitt A bei 4 von 5 Pferden olfaktorisches Epithel auffindbar. Bei einem Pferd war es jedoch auch noch im Ansatzbereich des Nasenseptums des Querschnitts B zu finden. Die epitheliale Auskleidung der äußeren begrenzenden Wand des Cavum nasi selbst bestand überwiegend aus respiratorischem Epithel. Lediglich im Übergangsbereich zu den Nasenmuscheln war bei einem Pferd im Querschnitt C noch Riechepithel zu finden. Auffallend war, dass sich das Riechepithel in allen Querschnitten, in denen es nachweisbar war, stets mit Abschnitten von respiratorischem Epithel abwechselte. Die Querschnitte E - M beinhalteten ausschließlich respiratorisches Epithel und, weiter rostral gelegen, auch einschichtiges kubisches Epithel bzw. mehrschichtiges verhorntes Plattenepithel im Bereich der Nasenöffnungen.

4.1.1.1 Quantitative Auswertung des Anteils des olfaktorischen Epithels

Im Querschnitt A konnte im Bereich der Lamina perpendicularis (Lokalisation 1) bei 4 von 5 Pferden zwischen 60 und 80 % olfaktorisches Epithel nachgewiesen werden. Im Querschnitt B war in dieser Lokalisation nur noch bei einem Pferd 20 % olfaktorisches Epithel zu finden. In den Querschnitten C und D war bei keinem der Pferde in dieser Lokalisation Riechepithel vorhanden. Für die Lamina perpendicularis bzw. für das Nasenseptum fand sich folglich eine starke Reduzierung des Riechepithels von den caudalen zu den rostralen Bereichen.

Im dorsalen Bereich der Nasenmuscheln (Lokalisation 2) wurde ebenfalls von caudal nach rostral eine Abnahme des olfaktorischen Epithels beobachtet. So waren im Querschnitt A in den 5 Pferden zwischen 60 und 100 % des vorhandenen Epithels Riechepithel. Im

Querschnitt B lag der Anteil zwischen 40 und 80 %. Im Querschnitt C fand sich nur in 4 von 5 Pferden Riechepithel, wobei der Anteil in diesen Tieren zwischen 20 und 60 % lag. Im Querschnitt D war nur noch bei einem Pferd 40 % Riechepithel nachweisbar. Ein vergleichbares Bild war in den mittleren und ventralen Bereichen der Nasenmuscheln zu finden. In der Lokalisation 3 (mittlerer Bereich der Nasenmuscheln) lag der Anteil des Riechepithels im Querschnitt A zwischen 60 und 100 %, im Querschnitt B zwischen 60 und 80 %, im Querschnitt C zwischen 20 und 60 %, wobei nur in 4 von 5 Pferden in diesem Bereich olfaktorisches Epithel vorhanden war. Im Querschnitt D war in 3 der 5 untersuchten Pferde 20 % Riechepithel nachzuweisen. Im ventralen Bereich der Nasenmuscheln (Lokalisation 4) lagen die prozentualen Anteile des olfaktorischen Epithels am gesamten Epithel bei den untersuchten Tieren im Querschnitt A zwischen 40 und 80 %, im Querschnitt B zwischen 40 und 60 % und im Querschnitt C zwischen 20 und 80 %. Im Querschnitt D war lediglich bei einem Pferd ein Anteil von 40 % Riechepithel zu finden. Insgesamt fand sich folglich der höchste Anteil des Riechepithels in den caudodorsalen Bereichen der Nasenmuscheln, der stetig in rostraler Richtung abnahm.

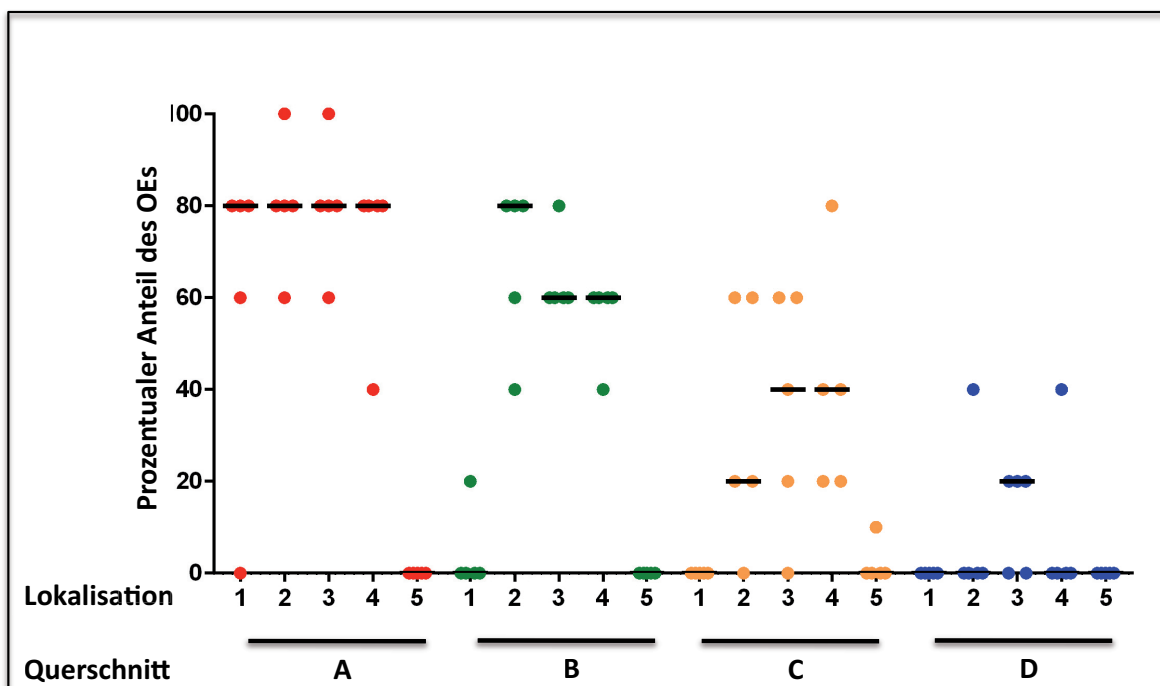
Im Bereich der Begrenzung der Nasenhöhle (Lokalisation 5) konnte lediglich bei einem Pferd in Querschnitt C im Übergang zu den Nasenmuschel 10 % Riechepithel detektiert werden. Die Anteile des Riechepithels der untersuchten Pferde und der Median sind in Abb. 7 graphisch dargestellt und in Tab. 20 aufgeführt.

Mit der zweifaktoriellen Varianzanalyse mit Messwiederholungen bezüglich Querschnitt und Lokalisation wurde explorativ anhand der arithmetrischen Mittelwerte (Tab. 20) überprüft, in welchen Querschnitten und in welchen Lokalisationen der Pferdenase das olfaktorische Epithel mengenmäßig vorkommt. Im Gesamtvergleich fanden sich sowohl signifikante Unterschiede im Gehalt des olfaktorischen Epithels zwischen den Querschnitten A - D als auch zwischen den einzelnen Lokalisationen ($p < 0,0001$). Weiterhin lag eine signifikante Wechselwirkung zwischen Querschnitt und Lokalisation vor. Das bedeutet, dass die Unterschiede im Anteil des olfaktorischen Epithels zwischen den Lokalisationen abhängig vom Querschnitt waren ($p < 0,0001$). Der Gehalt des olfaktorischen Epithels nahm insgesamt in den Lokalisationen Nasenseptum und Nasenmuscheln von caudal nach rostral in den Querschnitten A - D ab, wobei in Querschnitten A und B zusätzlich eine Abnahme von dorsal nach ventral im Bereich der Nasenmuscheln nachweisbar war (Abb. 7). Im Bereich der Begrenzung der Nasenhöhle war nur sporadisch im Übergangsbereich zu den Conchen oder zum Nasenseptum Riechepithel zu finden.

Zusätzlich wurde ein exakter Friedman-Test mit einer α -Adjustierung nach Bonferoni-Holm (im Folgenden durch [] gekennzeichnet) zum Vergleich der Differenzen der Querschnitte durchgeführt, um die statistische Signifikanz der Beobachtungen durch diesen nicht-parametrischen Test abzusichern. Zunächst wurde untersucht, ob eine generelle

Wechselwirkung bzw. Abhängigkeit zwischen den Querschnitten und den Lokalisationen bestand. Hierzu wurde die Differenz der Querschnitte B bis D zum Querschnitt A als Referenz gebildet. Signifikante generelle Wechselwirkungen zwischen Querschnitt und Lokalisation konnten dabei für die Querschnitte C ($p=0,0027$ [0,017]) und D ermittelt werden (0,0165 [0,025]). Nicht signifikant war hingegen die Differenz zum Querschnitt B ($p=0,1192$ [0,050]). Anschließend wurde untersucht, ob die Unterschiede in den Anteilen des olfaktorischen Epithels in den Lokalisationen abhängig vom Querschnitt waren. Dies konnte für die Querschnitte A ($p=0,0008$ [0,025]), B ($p<0,0001$ [0,013]) und C ($p=0,0004$ [0,017]) bestätigt werden. Lediglich beim Querschnitt D waren die Unterschiede in den Lokalisationen nicht von Querschnitt abhängig ($p=0,22$ [0,050]). Umgekehrt wurde daneben untersucht, ob die Unterschiede in den Anteilen des olfaktorischen Epithels in den Querschnitten abhängig von der Lokalisation waren. Dies traf für die Lokalisationen 1 ($p=0,0156$ [0,025]), 2 ($p=0,0001$ [0,010]), 3 ($p=0,0001$ [0,013]) sowie 4 ($p=0,015$ [0,017]) zu. Für die Lokalisation 5 konnte dies nicht bestimmt werden, da nur bei einem Pferd olfaktorisches Epithel in diesem Bereich vorkam.

Abb. 7: Prozentualer Anteil des olfaktorischen Epithels am gesamten Epithel



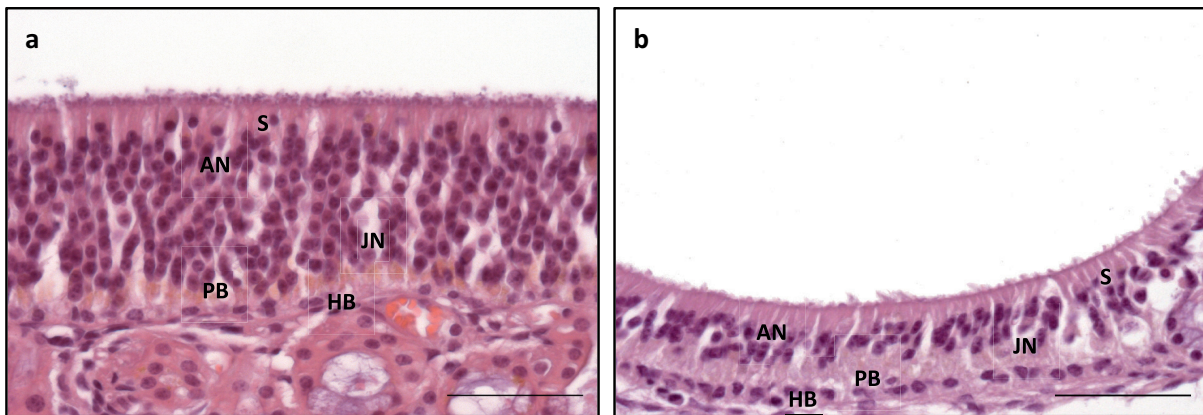
x-Achse: Lokalisationen aufgeteilt nach Querschnitten A - M, Riechepithel nur nachweisbar in A - D; y-Achse: Prozentualer Anteil des olfaktorischen Epithels (OEs) am gesamten Epithel auf dem jeweiligen Schnitt; Lokalisation 1: Nasenseptum, 2: dorsaler Anteil Nasenmuscheln, 3: mittlerer Anteil Nasenmuscheln, 4: ventraler Anteil Nasenmuscheln, 5: Begrenzung der Nasenhöhle; Balken: Median

4.1.2 Verteilung der verschiedenen Typen des olfaktorischen Epithels

Der Grundaufbau des Epithels und die Zellmorphologie entsprachen der für Säugetiere beschriebenen Gestalt (GRAZIADEI und GRAZIADEI, 1979; MORRISON und COSTANZO, 1992; MURDOCH und ROSKAMS, 2007). Im H&E-gefärbten Schnitt konnten jedoch zwei verschiedene Typen des Epithels gefunden werden (Abb. 8). Angelehnt an die Beobachtungen von Bock *et al.* (BOCK *et al.*, 2009) wurden die Typen als Typ A und B bezeichnet.

Der Typ A war durch meist mehr als 15 Lagen von Zellkernen gekennzeichnet. Auffällig war weiterhin, dass die Zone in der sich die apikal gelegenen Zellkerne befanden, eine eher unregelmäßigen Abschlusslinie bildeten, die meist dicht bis an den luminalen Pol des Epithels reichte. Der luminale Abschluss dieses Typs wies häufig eine unregelmäßige Oberfläche auf, auf der nicht gleichmäßig angeordnete Zilien zu finden waren. Die Organisation des einschichtigen mehrreihigen Epithels erschien insgesamt eher unstrukturiert. Die reifen olfaktorischen Neurone, die den überwiegenden Teil der Zellen dieses Epithels darstellten, wiesen einen euchromatinreichen Kern mit ein bis zwei gut abgrenzbaren Nukleoli auf. Die unreifen und weiter basal gelegenen Neurone besaßen einen, im Vergleich zu den reifen Neuronen, teils eher längsovalen Zellkern mit einem höheren Anteil von Heterochromatin und weniger deutlich sichtbaren Nukleoli (Abb. 8a). Der Anteil der unreifen Neurone lag deutlich unter dem Anteil der reifen Neurone.

Das morphologisch als Typ B charakterisierte Riechepithel fiel dadurch auf, dass die am weitesten apikal gelegenen Zellkerne einen geraden Abschluss bildeten und dass bis zum Epithelabschluss eine teils sehr breite kernfreie Zone, im Verhältnis zu restlichen Breite des Epithels, zu erkennen war, in der nur wenige Kerne von Stützzellen zu finden waren. Der luminale Epithelabschluss wies im Vergleich zum Epithel Typ A eine regelmäßige Oberfläche auf. Die Dicke des Epithels belief sich oft auf weniger als 10 Zelllagen, in manchen Bereichen fanden sich lediglich 5 Zelllagen. Die Struktur des Epithels erschien zudem geordneter aber deutlich aufgelockerter, was dadurch zustande gekommen sein kann, dass eine geringere Anzahl Zellen vorhanden waren. Insgesamt war die Menge der reifen Neurone, die durch den hellen, euchromatischen Zellkern mit den deutlich abgrenzbaren Nukleoli gekennzeichnet waren, deutlich geringer (Abb. 8b) Die Menge der juvenilen Neurone, die an ihren etwas längsovaleren Kern erkennbar waren, war vergleichbar mit der Menge, die im Epithel Typ A zu finden war (Abb. 8b).

Abb. 8: Verschiedene Typen des olfaktorischen Epithels

a: olfaktorisches Epithel Typ A, b: olfaktorisches Epithel Typ B; S: Stützzellen; AN: adulte Neurone; JN: juvenile Neurone; PB: proliferierende Basalzellen; HB: horizontale Basalzellen; H&E-Färbung; Balken: 50 µm

4.1.2.1 Quantitative Auswertung des Anteils der verschiedenen Epitheltypen

Innerhalb der frontal gesägten Querschnitte A - D waren stets Typen A und B des olfaktorischen Epithels vorhanden. Es waren jedoch deutliche Unterschiede zwischen den Anteilen bei den verschiedenen Querschnitten erkennbar, sodass eine quantitative Einteilung möglich war. Die unter 3.1.2.1 und 4.1.1.1 angegebenen prozentualen Anteile des olfaktorischen Epithels wurden nach den oben beschriebenen morphologischen Kriterien in die Anteile der Typen A und B aufgeteilt. In der Abb. 9 sind die Anteile des olfaktorischen Epithel graphisch dargestellt.

Im Querschnitt A konnte in allen 5 Lokalisation festgestellt werden, dass die Anteile des Epitheltyps A größer waren als die des Typs B. So lagen die Anteile des Epitheltyps A im Bereich der Lamina perpendicularis (Lokalisation 1) bei 4 von 5 Pferden zwischen 30 und 70 % und die des Epitheltyps B zwischen 10 und 30 %. Bei einem Pferd war in diesem Bereich kein Riechepithel zu finden. Im dorsalen Bereich der Nasenmuscheln (Lokalisation 2) waren zwischen 40 und 80 % dem Typ A und immer 20 % dem Typ B zuzuordnen. In den mittleren und ventralen Bereichen der Nasenmuscheln, was den Lokalisationen 3 und 4 entsprach, entsprachen zwischen 40 und 80 % bzw. zwischen 20 und 60 % dem olfaktorischen Epithel Typ A. Korrespondierend dazu lag der Anteil des Epitheltyps B für die Lokalisationen 3 und 4 zwischen 20 und 30 %. Im Querschnitt A war kein olfaktorisches Epithel im Bereich der Begrenzung der Nasenhöhle zu finden (Lokalisation 5).

In dem weiter rostral gelegenen Querschnitt B war nur wenig Riechepithel bei einem der Pferde auf dem Nasenseptum, hier auch nur im Ansatzbereich, zu finden. Typ A und B waren dabei mit 10 % gleichermaßen vertreten. Im Bereich der Nasenmuscheln waren ähnliche Tendenzen wie im Querschnitt A zu finden, jedoch war hier insgesamt weniger

Epithel Typ A nachweisbar. Im Bereich der Nasenmuscheln (Lokalisationen 2 bis 4) lagen die Anteile des Typs A von dorsal nach ventral zwischen 20 und 60 %, 30 und 60 % sowie zwischen 20 und 40 %. Für den Typ B konnten in diesen Bereichen von dorsal nach ventral Werte zwischen 20 und 40 %, 10 und 30 % sowie zwischen 20 und 30 % ermittelt werden. Im Querschnitt B war auf der knöchernen Begrenzung der Nasenhöhle kein Riechepithel zu finden.

Im Querschnitt C war kein Riechepithel auf dem Nasenseptum vorhanden. Im Bereich der Nasenmuscheln zeigte sich im Vergleich zu den Querschnitten A und B ein anderes Verteilungsmuster. In den dorsalen Arealen waren vom Typ A Anteile zwischen 10 und 50 % zu finden, wobei ein Pferd in diesem Bereich kein Riechepithel besaß. In den mittleren Bereichen lagen die Anteile des Epitheltyps A zwischen 10 und 30 % bei 3 von 5 Pferden und im Bereich der ventralen Areale zwischen 10 und 40 % bei 4 von 5 Pferden. Die Anteile des Typs B lagen im dorsalen Bereich zwischen 10 und 30 %, im mittleren Bereich zwischen 20 und 30 %, wobei jeweils nur 4 von 5 Pferden dort Riechepithel Typ B aufwiesen. In den ventralen Arealen der Nasenmuscheln fanden sich zwischen 10 und 40 % olfaktorisches Epithel Typ A in 4 von 5 Pferden bzw. zwischen 10 und 40 % des Typs B in allen 5 untersuchten Pferden. Auf der Begrenzung der Nasenhöhle fand sich bei einem Pferd am Übergang zu den Nasenmuscheln ein Areal, auf dem olfaktorisches Epithel Typ B zu finden war, welches etwa einen Anteil von 10 % des gesamten Epithels ausmachte.

Im Querschnitt D war, wie auch im Querschnitt C, kein Riechepithel auf dem Nasenseptum zu finden. Auch auf den Nasenmuscheln waren nur noch kleine Areale mit Riechepithel vorhanden. Im dorsalen und im ventralen Bereich der Nasenmuscheln fand sich lediglich bei einem Pferd ein Anteil von 10 % des olfaktorischen Epithels Typ A. Im mittleren Bereich traf dies noch für 2 Pferde zu. In allen drei Bereichen der Nasenmuscheln überwog der Anteil des Typs B. Bei der Untersuchung dieses Typs wurde im dorsalen und im ventralen Bereich bei jeweils einem Pferd ein Anteil des Typs B gefunden. Im mittleren Bereich wiesen 3 der 5 Pferde olfaktorisches Epithel des Typs B auf, welches einen Anteil von 10 oder 20 % ausmachte. Die prozentualen Anteile der Typen des Riechepithels und der Median sind in Abb. 9 graphisch dargestellt.

Anhand der dreifaktoriellen Varianzanalyse mit Messwiederholung bezüglich Querschnitt, Lokalisation und Typ wurde explorativ untersucht, in welchen Querschnitten und in welchen Lokalisationen der Pferdenase welcher Typ des olfaktorischen Epithels dominiert. Es konnte bestätigt werden, dass bei globaler Betrachtung signifikante Unterschiede der Typen A und B in Querschnitt und Lokalisation zu finden waren ($p < 0,0001$). Die Unterschiede der Anteile der verschiedenen Typen des Epithels waren bei globaler Betrachtung jedoch nur knapp nicht signifikant ($p = 0,0697$). Bei Untersuchung der zweifachen Wechselwirkung der Parameter konnte festgestellt werden, dass signifikante Wechselwirkungen von Querschnitt und

Lokalisation ($p < 0,0001$), von Querschnitt und Epitheltyp ($p < 0,0001$) sowie von Lokalisation und Epitheltyp ($p = 0,0091$) bestanden. Die Unterschiede im Gehalt der Typen A und B des olfaktorischen Epithels waren folglich abhängig vom Querschnitt oder der Lokalisation. Auch die dreifache Wechselwirkung der untersuchten Parameter aus Querschnitt, Lokalisation und Typ waren hinsichtlich ihrer Unterschiede signifikant ($p < 0,0001$). Folglich waren die unterschiedlichen Mengen der Typen A und B des olfaktorischen Epithels sowohl vom Querschnitt als auch von der Lokalisation abhängig.

Darüber hinaus wurde ein exakter Friedman-Test mit einer α -Adjustierung nach Bonferoni-Holm (im Folgenden durch [] gekennzeichnet) zum Vergleich der Differenzen der Querschnitte durchgeführt, um die statistische Signifikanz der Beobachtungen durch diesen nicht-parametrischen Test abzusichern. So wurde zunächst getrennt nach Epitheltyp A und B untersucht, ob eine generelle Wechselwirkung zwischen den Querschnitten und den Lokalisationen bestand, das heißt, ob sich die ermittelten Unterschiede gegenseitig bedingten. Hierzu wurde wie bereits unter 4.1.1.1 beschrieben die Differenz der Querschnitte zum Querschnitt A als Referenz gebildet. Für den Epitheltyp A waren signifikante Wechselwirkungen dabei für die Querschnitte C ($p = 0,0033$ [0,017]) und D nachweisbar ($0,0057$ [0,025]). Nicht signifikant war die Differenz zum Querschnitt B ($p = 0,0794$ [0,050]), der hinsichtlich der ermittelten Anteile des olfaktorischen Epithels und der Verteilung über die Lokalisationen sehr dem Querschnitt A ähnelte. Anschließend wurde untersucht, ob die Unterschiede in den Anteilen des olfaktorischen Epithels, bezogen auf den Epitheltyp A, in den Lokalisationen abhängig vom Querschnitt waren. Dies konnte für die Querschnitte A ($p = 0,0019$ [0,017]), B ($p < 0,0001$ [0,013]) und C ($p = 0,007$ [0,025]) bestätigt werden. Nur beim Querschnitt D waren die Unterschiede in den Lokalisationen nicht von Querschnitt abhängig ($p = 0,76$ [0,050]), da hier nur noch in einzelnen Fällen Riechepithel nachgewiesen werden konnte. Korrespondierend dazu wurde untersucht, ob die Unterschiede in den Anteilen des olfaktorischen Epithels in den Querschnitten abhängig von der Lokalisation waren. Dies traf für die Lokalisationen 1 ($p = 0,0156$ [0,025]), 2 ($p = 0,0001$ [0,010]), 3 ($p = 0,0001$ [0,013]) sowie 4 ($p = 0,0025$ [0,017]) zu. In den verschiedenen Querschnitten wurden demnach signifikante Unterschiede in den Anteilen des olfaktorischen Epithels für die jeweiligen Lokalisationen ermittelt. Für die Lokalisation 5 konnte dies nicht bestimmt werden, da bei keinem der 5 Pferde olfaktorisches Epithel in diesem Bereich zu finden war. Für den Typ B des olfaktorischen Epithels wurde zunächst entsprechend die generellen Wechselwirkungen zwischen Querschnitt und Lokalisationen bestimmt. Für keinen der Querschnitte fand sich eine signifikante Wechselwirkung zwischen den Lokalisationen (Differenz jeweils zu Querschnitt A; B: $p = 0,0739$ [0,050], C: $p = 0,1224$ [0,017], D: $p = 0,1738$ [0,025]). Aus diesem Grund wurden die Lokalisationen gemittelt über die Querschnitte ($p < 0,0001$ [0,050]) und umgekehrt ($p = 0,0076$ [0,050]) global untersucht, woraufhin eine signifikante Abhängigkeit

ermittelt wurde. Demnach waren nur bei globaler Betrachtung die Unterschiede in den Anteilen des olfaktorischen Epithels Typ B in den Lokalisationen von den Querschnitten und die Unterschiede in den Querschnitten von den Lokalisationen abhängig.

Weiterhin wurde getrennt nach den 5 verschiedenen Lokalisationen mittels des exakten Friedman-Tests untersucht, ob generelle Wechselwirkungen bzw. Abhängigkeiten zwischen Epitheltyp und Querschnitt bestanden. Signifikante Wechselwirkungen (für $\alpha=0,05$) wurden hierbei für die Lokalisationen 2 ($p=0,0009$), 3 ($p=0,0004$) und 4 ($p=0,0026$), welche den drei untersuchten Bereichen der Nasenmuscheln entsprachen, ermittelt. Für das Nasenseptum waren die Wechselwirkungen knapp nicht signifikant ($p=0,0625$) und für die Begrenzung der Nasenhöhle war dieser Test nicht möglich, da nur bei einem Pferd olfaktorisches Epithel vom Typ B vorhanden war. Für die Lokalisation 1 wurden weiterführend global betrachtet für alle Querschnitte gemittelt über die Epitheltypen signifikante Unterschiede in den Anteilen des olfaktorischen Epithels berechnet ($p=0,01563$ [0,050]). Umgekehrt waren jedoch keine signifikante Unterschiede der Typen gemittelt über die Querschnitte nachweisbar ($p=0,25$ [0,050]). Das bedeutet, dass bei globaler Betrachtung in der Lokalisation 1 nur die Unterschiede zwischen den Querschnitten signifikant waren, wenn beide Epitheltypen zusammengefasst wurden. Für die Lokalisation 2 wurde für die Querschnitte A und B gezeigt, dass die Unterschiede in den Typen nicht vom Querschnitt anhängig waren ($p=0,0625$ [0,013] bzw. $p=0,25$ [0,017]). In beiden Querschnitten zeigte sich eine ähnliche Verteilung beider Epitheltypen. Für die Querschnitte C und D war der exakte Friedman-Test nicht möglich, da nicht alle histologischen Schnitte Riechepithel beider Typen enthielten. Darüber hinaus wurde für die Lokalisation 2 bestimmt, dass die ermittelten Unterschiede der Anteile des Riechepithels in den verschiedenen Querschnitten vom Epitheltyp A abhängig waren ($p<0,0001$ [0,025]), wohingegen dies nicht für den Epitheltyp B zutraf ($p=0,1468$ [0,050]). Folglich fanden sich für die Lokalisation 2 nur signifikante Unterschiede bei Betrachtung des Epitheltyps A. Ähnliche Effekte wurden für die Lokalisation 3 berechnet. Auch hier waren die ermittelten Unterschiede in den Anteilen des OEs der Epitheltypen nicht von den Querschnitten A bis C abhängig ($p=0,0625$ [0,013], $p=0,25$ [0,017] und $p=0,5$ [0,025]). Für den Querschnitt D war die Berechnung aufgrund des nicht-vorhandenen Riechepithels in einigen Proben nicht möglich. Trotzdem wurde in dieser Lokalisation umgekehrt ermittelt, dass die Unterschiede in den Querschnitten vom Typ A abhängig waren ($p<0,0001$ [0,025]), jedoch nicht vom Typ B ($p=0,1126$ [0,050]). Für die Lokalisation 4 war eine Berechnung, ob die Unterschiede in den Epitheltypen abhängig vom Querschnitt waren nur für den Querschnitt A möglich. Allerdings waren hier keine Abhängigkeit nachzuweisen ($p=0,125$ [0,013]). Es wurde jedoch berechnet, dass der Unterschied in den Querschnitten signifikant nur vom Epitheltyp A ($p=0,0025$ [0,025]) und nicht vom Epitheltyp B abhängig war ($p=0,1094$ [0,050]). Für die Lokalisation 5, die der Begrenzung der Nasenhöhle entsprach,

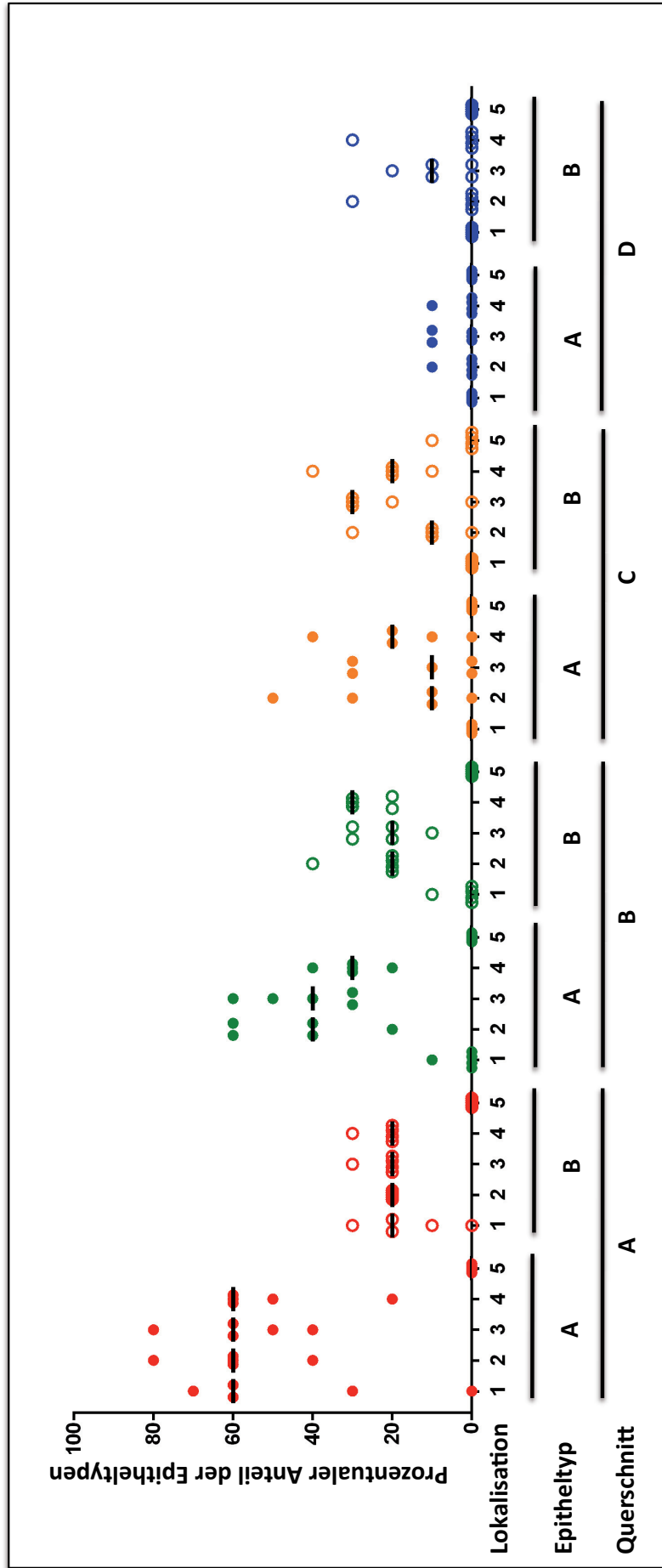
waren diese Berechnungen nicht möglich, da hier nur selten olfaktorisches Epithel zu finden war und somit zu wenig Werte für den exakten Friedman-Test vorlagen.

Zuletzt wurde getrennt nach den Querschnitten A bis D mit dem exakten Friedman-Test untersucht, ob generelle signifikante Wechselwirkungen (alle $\alpha=0,05$) zwischen Epitheltyp und den untersuchten Lokalisationen vorlagen. Dies war für die Querschnitte A ($p=0,0054$) und B ($p=0,024$) der Fall, nicht jedoch für die Querschnitte C und D ($p=0,18$ bzw. 1), wo die mengenmäßigen Unterschiede zwischen den Epitheltypen weniger ausgeprägt waren. Für die Querschnitte A und B, bei denen Wechselwirkungen zwischen Epitheltyp und Lokalisation nachgewiesen wurden, wurde zusätzlich getrennt nach den Lokalisationen untersucht, ob die unterschiedlichen Anteile des olfaktorischen Epithels in beiden Epitheltypen abhängig von der Lokalisation waren. Dies war beim Querschnitt A für die Lokalisationen 1 bis 4 nicht der Fall ($p=0,25$ [0,025], $p=0,0625$ [0,010], $p=0,0625$ [0,013] und $p=0,125$ [0,017]). Der Gehalt des Riechepithels beider Typen war im Querschnitt A demnach nicht von den Lokalisationen abhängig. Für die Lokalisation 5 konnte der Friedman-Test nicht bestimmt werden, da bei dieser Lokalisation nicht in allen Querschnitten olfaktorisches Epithel vorhanden war. Umgekehrt waren jedoch die Unterschiede in den Lokalisationen abhängig vom Epitheltyp A ($p=0,0019$ [0,025]) und vom Epitheltyp B ($p=0,0034$ [0,050]). Auch im Querschnitt B ergaben sich bei Betrachtung der Epitheltypen keine signifikanten Unterschiede der Epitheltypen, die von den Lokalisationen abhängig waren, wobei dies nur für die Lokalisationen 2 und 3 berechnet werden konnten ($p=0,25$ [0,010] bzw. $p=0,25$ [0,013]), da für die Lokalisationen 1, 4 und 5 nicht immer beide Epitheltypen nachweisbar waren. Daneben wurde jedoch berechnet, dass die Unterschiede in den Lokalisationen abhängig von beiden Epitheltypen waren (A: $p<0,0001$ [0,025] und B: $p=0,00014$ [0,050]). Da für den Querschnitt C keine Wechselwirkungen zwischen Lokalisation und Epitheltyp nachzuweisen waren, wurden die Unterschiede der Epitheltypen gemittelt über die Lokalisationen betrachtet, wobei sich jedoch keine signifikante Abhängigkeit nachweisen ließ ($p=1$ [0,050]). Folglich dominierte keiner der Epitheltypen in einer Lokalisation. Jedoch waren umgekehrt die Unterschiede in den Lokalisationen gemittelt über beide Epitheltypen signifikant ($p=0,00044$ [0,05]). Unabhängig von den Epitheltypen wurde so bestätigt, dass die beobachteten unterschiedlichen Mengen des olfaktorischen Epithels, mit den größten Anteilen des OEs im Bereich der Nasenmuscheln, in den verschiedenen Lokalisationen global betrachtet signifikant waren. Für den Querschnitt D konnten weder für die Epitheltypen gemittelt über die Lokalisationen ($p=0,5$ [0,050]) noch für die Lokalisationen gemittelt über beide Epitheltypen ($p=0,22$ [0,050]) signifikante Abhängigkeiten nachgewiesen werden.

Bei Betrachtung der gesamten Pferdenase konnte gezeigt werden, dass der Typ A des olfaktorischen Epithels in allen Lokalisationen der zwei am weitesten caudal gelegenen Querschnitte A und B dominiert, wobei für die Nasenmuscheln eine Abnahme von caudal

nach rostral und von dorsal nach ventral zu verzeichnen war. In den Querschnitten C und D nahm der Anteil des Typs B verhältnismäßig stark zu und dominierte in fast allen Lokalisationen der Nasenmuscheln, bei insgesamt deutlich geringerem Gesamtanteil des olfaktorischen Epithels.

Abb. 9: Prozentuale Anteile der Typen des olfaktorischen Epithels am gesamten olfaktorischen Epithel



x-Achse: Lokalisationen aufgeteilt nach Querschnitten A - M, Riechepithel nur nachweisbar in A - D, und Epitheltypen A und B; y-Achse: Prozentualer Anteil des olfaktorischen Epithels am gesamten Epithel auf dem jeweiligen Schnitt: Lokalisation 1: Nasenseptum, 2: dorsaler Anteil Nasenmuscheln, 3: mittlerer Anteil Nasenmuscheln, 4: ventraler Anteil Nasenmuscheln, 5: Begrenzung der Nasenhöhle; Balken: Median

4.1.3 Immunhistologische Untersuchung des olfaktorischen Epithels und statistische Auswertung

Um weitere Hinweise darauf zu bekommen, ob das Riechepithel des Pferdes in allen Lokalisationen der Nase eine vergleichbare Zytoarchitektur aufweist, wurden vier wichtige Zelltypen immunhistologisch dargestellt. Hierbei wurden zur Markierung von juvenilen olfaktorischen Neuronen *Doublecortin* (DCX), für adulte olfaktorische Neurone *Olfactory marker protein* (OMP) sowie TrkA (Tyrosinkinase-Rezeptor-A) zur Darstellung von horizontalen und PCNA (*Proliferating cell nuclear antigen*) für proliferierenden Basalzellen verwendet (3.1.3). Die Untersuchung wurde an allen Gewebeschnitten durchgeführt, in denen in der H&E-Färbung morphologisch olfaktorisches Epithel identifiziert werden konnte. Zusätzlich wurden die Marker NSE (neuronenspezifische Enolase) und NeuN (*Neuron specific nuclear protein*) zur Darstellung olfaktorischer Neurone sowie Tyrosinhydroxylase (TH) zur Markierung von Nervenfasern an ausgewählten Lokalisationen getestet, um eine generelle Aussage zu ermöglichen, ob die jeweiligen Zelltypen diesen Marker beim Pferd exprimieren.

4.1.3.1 *Olfactory marker protein* (OMP)

Als zuverlässigster Marker zur Darstellung der adulten olfaktorischen Neurone im olfaktorischen Epithel des Pferdes erwies sich OMP. In den Bereichen, die im H&E-gefärbtem Gewebeschnitt als Riechepithel zu erkennen war, war immunhistologisch stets eine ausgeprägte positive Farbreaktion zu finden. Diese zeigte sich als dunkelbraune, granuläre bis diffuse Färbung der Zellkerne im mittleren Drittel des Epithels, die jedoch auch in manchen Bereichen in die basalen Bereiche des Riechepithels reichte. Dies steht im Gegensatz dazu, dass bei einigen Tierarten eine klare Trennlinie der verschiedenen Bereiche zwischen reifen und unreifen Neuronen postuliert wird. Das Zytoplasma der Neurone zeigte oft, aber nicht immer, eine diffuse Braunfärbung, sodass der nach apikal gerichtete Dendrit der Neurone bis zum Nasenlumen verfolgt werden konnte (Abb. 10a, c) Aufgrund der Morphologie der Zellen und der Lage der Zellkerne war davon auszugehen, dass es sich hierbei um die adulten Neurone handelte. Andere Zellen, insbesondere die weiter basal liegenden juvenilen Neurone, wiesen keine Anfärbung auf. In der Lamina propria unterhalb des Epithels konnte eine deutliche immunhistologische Reaktion in den Nervenfasern beobachtet werden (Abb. 10e). Diese war durch ein streifiges bis fleckiges und zum Teil diffuses Verteilungsmuster der braunen Anfärbung erkennbar. Die für OMP typische Anfärbung war sowohl im Typ A als auch im Typ B des olfaktorischen Epithels nachweisbar (Abb. 10a, c).

In den Bereichen, in denen im H&E-Schnitt Riechepithel zu finden war, war meist eine ausgeprägte und weitreichende Anfärbung der adulten Neurone zu verzeichnen, sodass der Score häufig bei 2 oder 3 lag, was einem prozentualen Anteil positiver Epithelabschnitte im Bereich von 30 - 70 % bzw. mehr als 70 % entsprach. In seltenen Fällen waren nur wenige Abschnitte auf dem Gewebeschnitt positiv, die zuvor morphologisch als olfaktorisches Epithel bestimmt worden waren und somit mit einem Score von 1 zu bewerten, was einem prozentualen Anteil zwischen 0 und 30 % entsprach. In den Fällen, in denen dies zutraf oder eine OMP-spezifische Anfärbung völlig fehlte, handelte es sich um Lokalisationen in Querschnitten C oder D und demnach in weiter rostral gelegenen Bereichen. Auch Bereiche ohne OMP-spezifische Markierung waren in Arealen von morphologisch erkennbarem olfaktorischem Epithel zu finden. Bezogen auf alle untersuchten Querschnitte und Lokalisationen des olfaktorischen Epithels konnte im Durchschnitt ein Score um 1 ermittelt werden, was im Bereich von 0 - 30 % positive Epithelabschnitte des vorhandenen Riechepithel entsprach. Insgesamt zeigte sich eine deutliche Abnahme positiver Zellen von caudal nach rostral, wobei die meisten OMP-positiven Neurone auf den Nasenmuscheln lokalisiert waren.

In der Lokalisation 1 (Nasenseptum) lag der Anteil der Epithelabschnitte mit markierten Neuronen im Querschnitt A, bezogen auf alle untersuchten Pferde, durchschnittlich im Bereich von 30 - 70 %, jedoch konnten auch Regionen gefunden werden, in denen keine positiven Zellen oder mehr als 70 % positive Epithelabschnitte vorkamen. Im weiter rostral gelegenen Querschnitt B fand sich eine Reduktion der positiven Epithelabschnitte auf einen durchschnittlichen prozentualen Anteil zwischen 0 und 30 %. Maximal konnten in dieser Lokalisation zwischen 30 - 70 % positive Epithelabschnitte gefunden werden. In den Querschnitten C und D war kein olfaktorisches Epithel mehr vorhanden und somit waren auch keine OMP-positiven Neurone nachweisbar.

In allen Lokalisationen der Nasenmuscheln (2 - 4) lag der Score im Querschnitt A bei 2 oder 3. Dies entsprach einer großen Anzahl von positiven olfaktorischen Neuronen und Anteilen von positiv markiertem Epithel im Bereich von 30 - 70 bzw. von über 70 %. Im Querschnitt B war eine leichte Reduktion der OMP-positiven Epithelabschnitte in den Lokalisationen 2 und 4 zu finden, wohingegen der Anteil in der Lokalisation 3 konstant blieb. Auch in diesem Querschnitt wurde trotzdem stets ein positiver Epithelanteil von 30 - 70 % oder von über 70 % gefunden, was einer mittleren oder hohen Anzahl positiver Riechnervenzellen entspricht. Eine weitere Reduktion konnte im Querschnitt C beobachtet werden. Bei der Betrachtung aller 5 Pferde konnten durchschnittlich positive Epithelabschnitte im Bereich von 0 - 30 % oder im Bereich von 30 - 70 % ermittelt werden, jedoch zeigten sich insbesondere in den dorsalen und mittleren Regionen der Nasenmuscheln Schwankungen zwischen 0 und mehr als 70 %. Das bedeutet, dass in diesen Lokalisationen teils keine positiven aber auch teils

sehr viele OMP-positive olfaktorische Neurone zu finden waren. Im Querschnitt D konnten durchschnittlich nur noch positive Epithelabschnitte im Bereich zwischen 0 und 30 % gefunden werden, was einer kleinen Anzahl OMP-positiver Neurone entspricht. Allerdings konnten auch hier Einzelwerte ermittelt werden, die markierten Epithelanteilen im Bereich von 30 - 70 % entsprachen.

Bei der Untersuchung der Begrenzung der Nasenhöhle konnten lediglich im Querschnitt C einzelne OMP-positive Neurone gefunden werden. Bezogen auf alle ausgewerteten Pferde resultierte dies in einem durchschnittlichen positiven Epithelanteil im Bereich von 0 - 30 %. In Abb. 11 sind die durchschnittlichen Scores für den OMP-Nachweis bezogen auf die Lokalisationen innerhalb der Querschnitte dargestellt. Bei fehlendem Nachweis des olfaktorischen Epithels wurde kein Score angegeben.

4.1.3.2 *Doublecortin (DCX)*

Zur immunhistologischen Darstellung juveniler olfaktorischer Neurone wurde der Marker *Doublecortin* verwendet. Das Färbungsmuster der Zellen ähnelte dem der mittels OMP-markierten Neurone. Als positive Reaktion wurde eine deutliche braune, granuläre bis diffuse Anfärbung der Zellkerne der Neurone bewertet. Diese lagen größtenteils weiter basal als die der adulten Neurone (Abb. 10b, d). Neben der Kernreaktion war auch eine hellbraune Anfärbung des Zytoplasmas und der Zellfortsätze zu finden, die jedoch nicht in allen Bereichen des Epithels auftrat. Die markerspezifische Anfärbung konnte sowohl im olfaktorischen Epithel des Typs A als auch des Typs B detektiert werden (Abb. 10b, d). Durch die Färbung der Zellfortsätze konnten die Dendriten, die in Richtung des Lumens ragten, jedoch nicht bis ganz zur Epitheloberfläche nachzuvollziehen waren, dargestellt werden. Die angefärbten Zellen wiesen meist eine eher längliche Gestalt auf und auch der Zellkern hatte eine rundovale Form. Dies steht im Gegensatz zu den mittels OMP markierten adulten Neuronen, die stets einen runden Zellkern besaßen (Abb. 7). Darüber hinaus konnte auch eine immunhistologische Reaktion in den Nervenfasern der Lamina propria beobachtet werden. Diese entsprach mit ihrem streifigen bis fleckigen und in einigen Bereichen diffusen Verteilungsmuster dem der mittels OMP markierten Nervenfasern. Insgesamt war diese Farbreaktion aber schwächer ausgeprägt (Abb. 10f). Wie auch für OMP wurde eine Abnahme positiver Epithelabschnitte in rostraler Richtung beobachtet, wobei die meisten DCX-positiven Zellen auf den Nasenmuscheln zu finden waren.

Bei der semiquantitativen Auswertung der Immunhistologie lag im Querschnitt A für die Lamina perpendicularis bzw. das Nasenseptum im Durchschnitt, bezogen auf alle untersuchten Pferde, ein Score zwischen 1 und 2 vor. Dies entsprach markierten Epithelanteilen von 0 - 30 % bzw. von 30 - 70 %. In den weiter rostral gelegenen

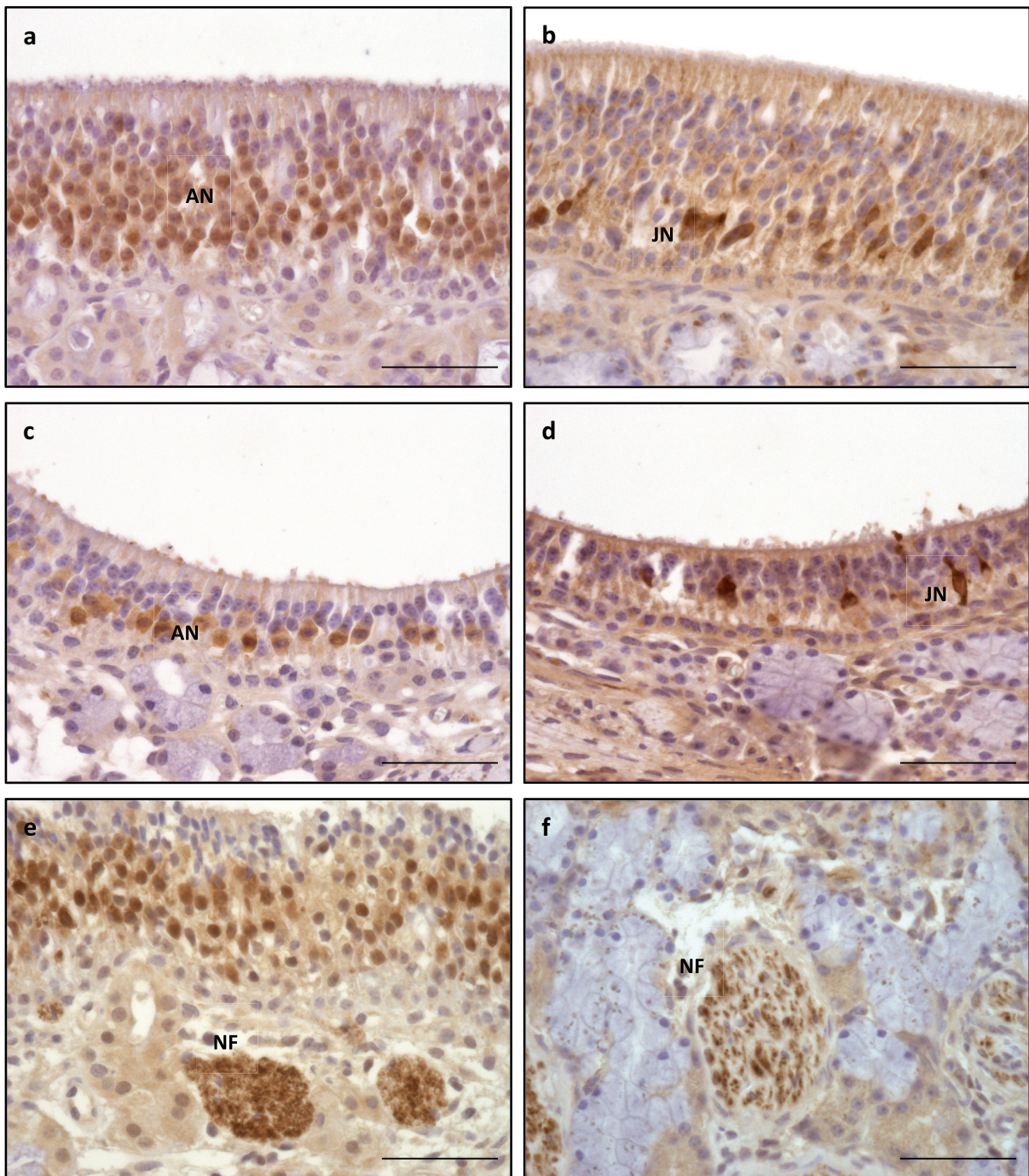
Querschnitten zeigte sich ein ähnliches Bild für diese Lokalisation wie bei dem Marker OMP. Im Querschnitt B konnte eine starke Abnahme DCX-positiver Zellen nachgewiesen werden, sodass nur einzelne Zellen in dieser Lokalisation positiv für DCX waren. In den Querschnitten C und D fand sich entsprechend keine positive Reaktion.

In dem am weitesten caudal gelegenen Querschnitt A wurde für den dorsalen Bereich der Nasenmuscheln (Lokalisation 2) ein Durchschnitt von positiven Epithelabschnitten im Bereich von 30 - 70 % am gesamten olfaktorischen Epithel ermittelt. Im mittleren und im ventralen Bereich (Lokalisationen 3 und 4) waren in den 5 untersuchten Pferden 0 - 30 % oder zwischen 30 und 70 % des olfaktorischen Epithels positiv für DCX. Im Gegensatz zu den erkennbaren Tendenzen beim Marker OMP konnten im Querschnitt B für die dorsalen und mittleren Areale in der Summe geringfügig mehr DCX-positive Zellen detektiert werden als im Querschnitt A. Im ventralen Bereich konnten nur etwas weniger positiv markierte Zellen gefunden werden. Im Querschnitt C wurde eine Reduktion der durchschnittlich ermittelten positiven Epithelabschnitte in den dorsalen und mittleren Bereichen verzeichnet (Lokalisation 2 und 3). Hier fanden sich jedoch Regionen, in denen zum Teil keine und zum Teil mehr als 70 % der Bereiche positiv für DCX waren. In der Lokalisation 4 hingegen konnte mit positiven Epithelabschnitten zwischen 30 und 70 % eine Erhöhung festgestellt werden. Erst im Querschnitt D kam es zu einer deutlichen Reduktion der DCX-Expression in allen 3 Lokalisationen der Nasenmuscheln.

Wie auch bei dem Marker OMP, wiesen in der Lokalisation 5 des Querschnitts C nur wenige Neurone des Riechepithels eine markerspezifische Anfärbung auf.

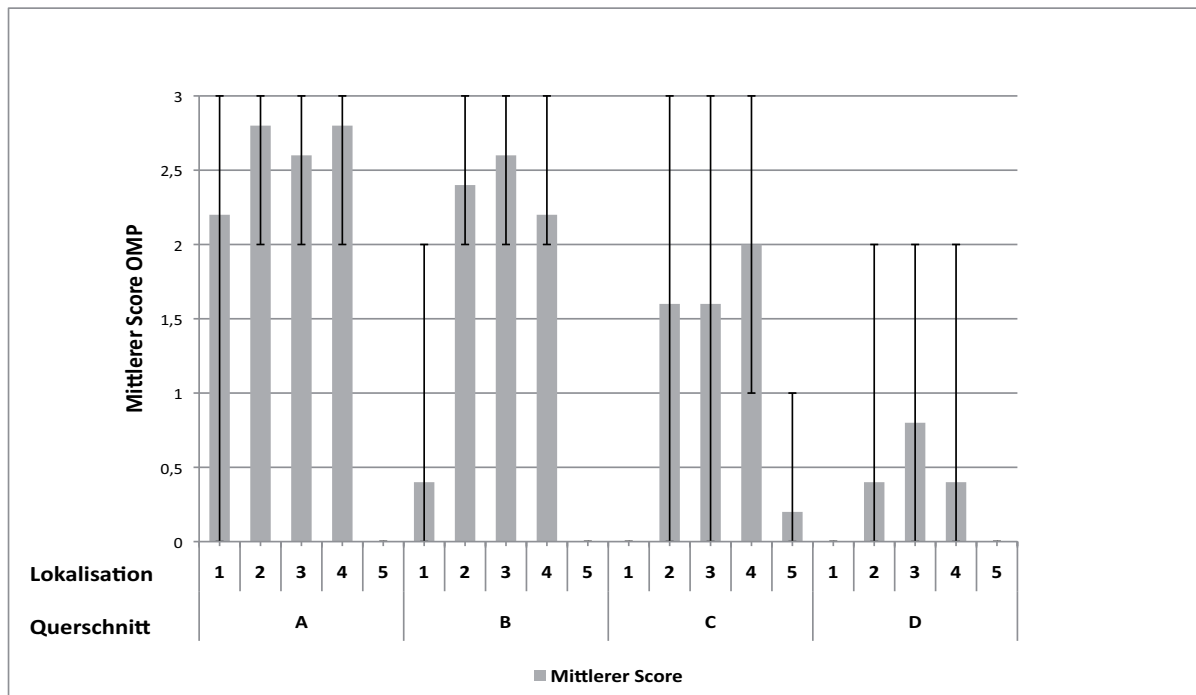
In Abb. 12 sind die mittleren Scores für den *Doublecortin*-Nachweis bezogen auf die Lokalisationen innerhalb der Querschnitte dargestellt. Bei fehlendem Nachweis des olfaktorischen Epithels wurde kein Score angegeben.

Abb. 10: Immunhistologischer Nachweis von OMP und DCX



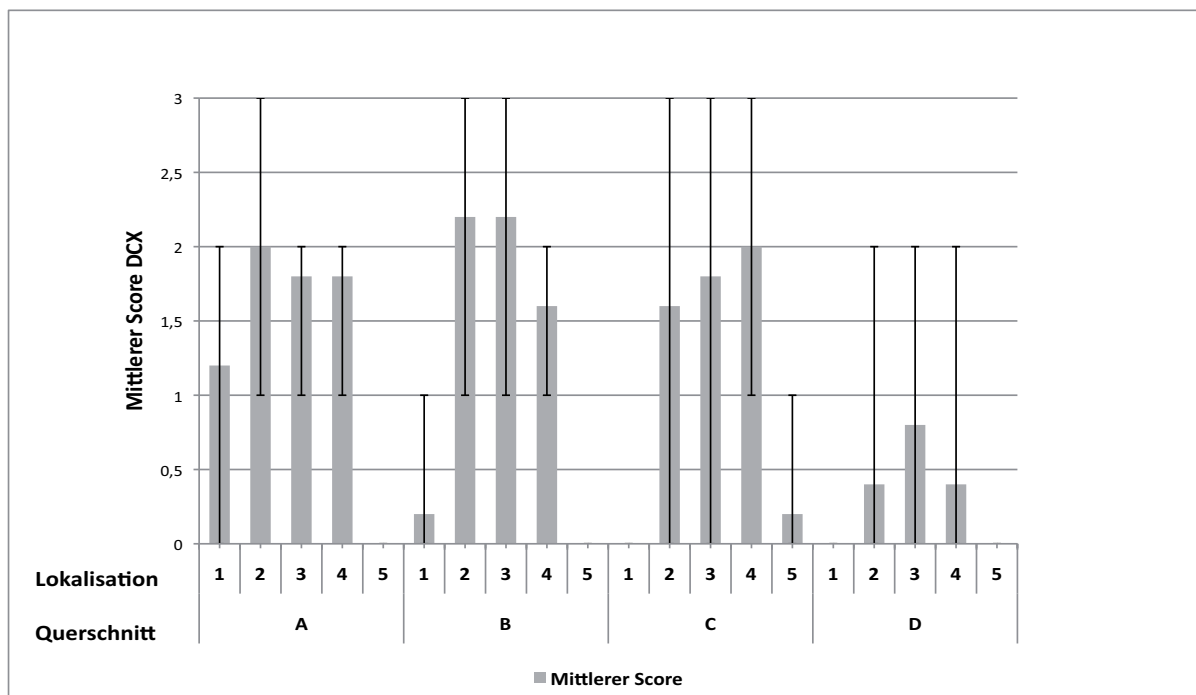
a, c, e: *Olfactory marker protein* (OMP); b, d, f: *Doublecortin* (DCX); a, b: olfaktorisches Epithel Typ A; c, d: olfaktorisches Epithel Typ B; AN: adulte Neurone; JN: juvenile Neurone; NF: Nervenfasern; Balken: 50 μ m

Abb. 11: Immunhistologischer Nachweis von OMP



x-Achse: Lokalisationen aufgeteilt nach Querschnitten; y-Achse: mittlerer Score für OMP; Lokalisation 1: Nasenseptum, 2: dorsaler Anteil Nasenmuscheln, 3: mittlerer Anteil Nasenmuscheln, 4: ventraler Anteil Nasenmuscheln, 5: Begrenzung der Nasenhöhle; arithmetischer Mittelwert; Fehlerbalken: minimaler/maximaler Wert

Abb. 12: Immunhistologischer Nachweis von DCX



x-Achse: Lokalisationen aufgeteilt nach Querschnitten; y-Achse: mittlerer Score für DCX; Lokalisation 1: Nasenseptum, 2: dorsaler Anteil Nasenmuscheln, 3: mittlerer Anteil Nasenmuscheln, 4: ventraler Anteil Nasenmuscheln, 5: Begrenzung der Nasenhöhle; arithmetischer Mittelwert; Fehlerbalken: minimaler/maximaler Wert

4.1.3.3 Proliferating cell nuclear antigen (PCNA)

Die proliferierenden Basalzellen wurden anhand der Expression von PCNA detektiert. Als positiv markierte Zellen wurden diejenigen bewertet, die eine fleckige bis diffuse dunkelbraune Färbung des Kerns aufwiesen. Eine zytoplasmatische Reaktion konnte bei diesem Marker nicht beobachtet werden. Die angefärbten Zellkerne der proliferierenden Basalzellen lagen stets in der Nähe der Basalmembran und waren in den Typen A und B des olfaktorischen Epithels zu finden. Daneben konnten auch abschnittsweise markierte Zellkerne der Stützzellen und Drüsenzellen in der Submukosa gefunden werden. Letztere beiden Beobachtungen flossen jedoch nicht in die immunhistologische und statistische Auswertung ein. Auffallend bei diesem Marker war, dass im Gegensatz zu OMP und DCX nur sehr wenige Areale des Riechepithels positiv markierte Zellen aufwiesen (Abb. 13a, c). Es handelte sich hierbei in der Regel um sehr kurze Epithelabschnitte, vor allem auf den Nasenmuscheln, in denen Gruppen weniger markierter Zellen oder einzelne positive Zellen zu finden waren. Die überwiegenden Bereiche der untersuchten Epithelabschnitte waren als negativ zu bewerten.

Insgesamt konnte nur für wenige Lokalisationen ein Score von 2 vergeben werden, was einer mittleren Anzahl markierter Zellen bzw. einem Anteil von 30 - 70 % markiertem positivem Riechepithel entsprach.

Markierte Zellen fanden sich im Bereich der Lamina perpendicularis bzw. im Bereich des Nasenseptums (Lokalisation 1) lediglich im Querschnitt A und hier auch nur in geringer Anzahl, sodass maximal 30 % der Epithelabschnitte positiv waren.

In den 3 untersuchten Arealen der Nasenmuscheln (Lokalisationen 2, 3 und 4) konnten nur geringe Unterschiede im Score innerhalb eines Querschnitts festgestellt werden. Im Querschnitt A konnten meist in 0 - 30 % des Riechepithels PCNA-positive Zellen detektiert werden. Bei einzelnen Pferden waren Regionen zu finden, in denen der Anteil zwischen 30 und 70 % lag, was einer mittleren Anzahl an PCNA-positiven Zellen entsprach. Im Querschnitt B war gegenüber dem Querschnitt A eine leichte Reduktion der positiven Zellen zu verzeichnen, jedoch lagen die positiven Epithelanteile im Durchschnitt ebenfalls im Bereich zwischen 0 und 30 %. Im Querschnitt C zeigte sich in allen 3 Bereichen der Nasenmuscheln eine leichte Erhöhung der PCNA-positiven Zellen. Im Querschnitt D konnten nur noch höchstens 30 % entsprechend markierte Epithelabschnitte gefunden werden.

Eine immunhistologische Markierung der proliferierenden Basalzellen im Bereich der Begrenzung des Cavum nasi konnte nicht detektiert werden. Die Ergebnisse dieser Auswertung sind in Abb. 14 dargestellt. Bei fehlendem Nachweis des olfaktorischen Epithels wurde kein Score angegeben.

4.1.3.4 Tyrosinkinase-Rezeptor-A (TrkA)

TrkA wird bei Nagern häufig zur Markierung der basal liegenden Vorläuferzellen des Riechepithels verwendet. Gleichzeitig werden bei der Verwendung dieses Markers jedoch auch die Stützzellen und Drüsenzellen in der Lamina propria markiert. Im olfaktorischen Epithel des Pferdes wurden die im Bereich der Basalmembran liegenden horizontalen Basalzellen markiert. Die Färbung war granulär, zytoplasmatisch und, je nach Schnittebene, war eine ringförmige Anfärbung der Zellmembran erkennbar (Abb. 13b, d). In manchen Bereichen griff diese Färbung auch auf den Zellkern über. Die Markierung war nicht in allen Arealen in gleicher Ausprägung aber im gesamten olfaktorischen Epithel nachvollziehbar und in den Typen A und B vorhanden. Daneben konnte eine granuläre, hellbraune Farbreaktion im Zytoplasma der Stützzellen gefunden werden, die oft apikal des Zellkerns ausgeprägt war (Abb. 13b). In der semiquantitativen Auswertung des Anteils der positiven Epithelabschnitte im Riechepithel zeigte die TrkA-Expression starke Unterschiede innerhalb eines Gewebeschnittes und zwischen den Querschnitten. Eine Abnahme der positiven Zellen von caudal nach rostral war weniger ausgeprägt als bei den OMP- und DCX-positiven Zellen und wurde erst im Querschnitt D deutlich. Auffallend war jedoch, dass insbesondere die ringartige Anfärbung der Zellmembran der horizontalen Basalzellen öfter und deutlicher in Epithelabschnitten vorkam, die zuvor als Riechepithel Typ B klassifiziert wurden (Abb. 13d). Weiterhin fiel auf, dass in einigen Bereichen des respiratorischen Epithels eine ähnliche und zum Teil noch stärker ausgeprägte, ringförmige Farbreaktion der Zellmembran von der Basalmembran anliegenden Zellen zu verzeichnen war. In einigen Abschnitten glich diese immunhistologische Reaktion einer Kette, die der Basalmembran anlag. Daneben zeigten auch einige zilientragende Zellen des respiratorischen Flimmerepithels eine feingranuläre bis diffuse hellbraune zytoplasmatische Reaktion, die apikal des Zellkerns deutlicher ausgeprägt war. Insgesamt war TrkA ebenfalls am stärksten auf den Nasenmuscheln nachweisbar, eine deutliche Reduktion in rostraler Richtung konnte erst ab Scheibe D nachgewiesen werden.

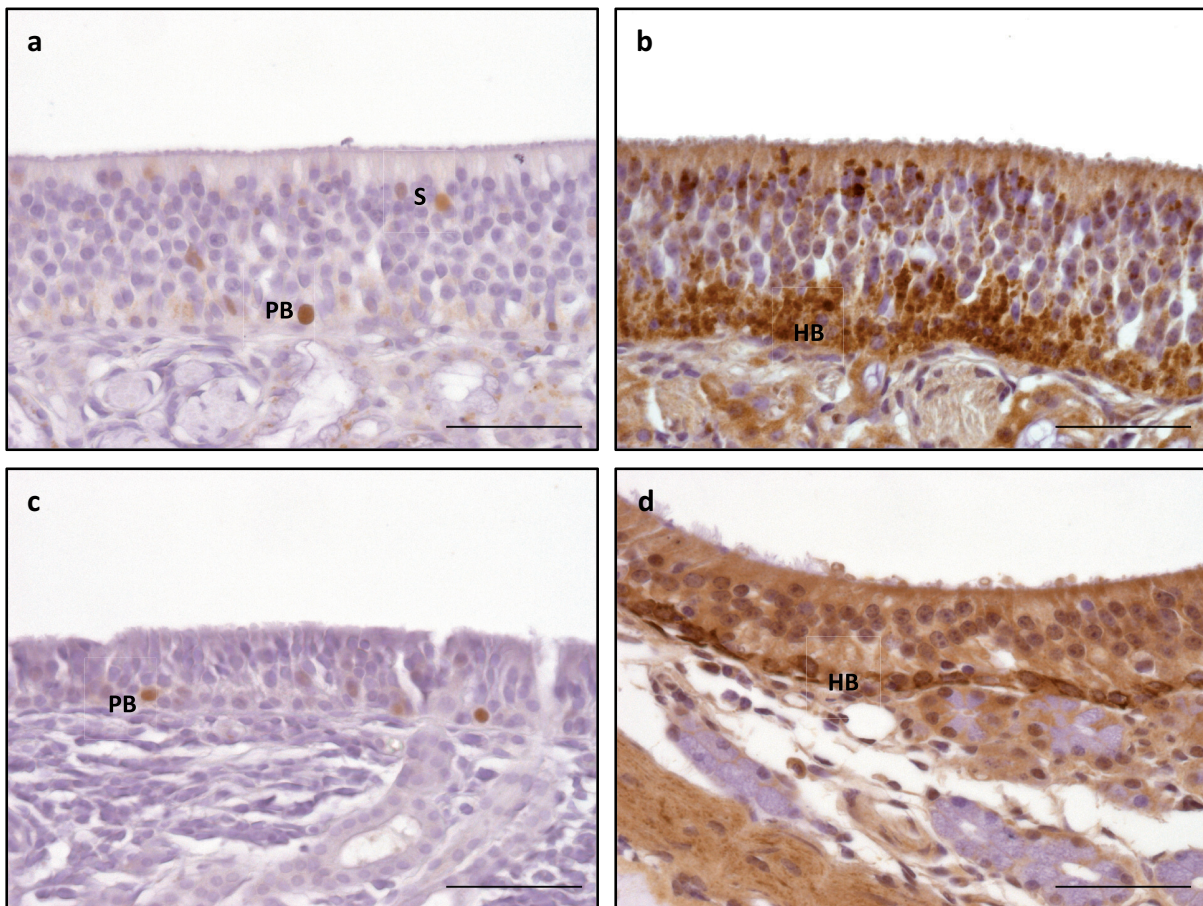
In der Lokalisation 1 (Lamina perpendicularis bzw. Nasenseptum) des Querschnitts A fanden sich bei einigen Tieren keine positiven Epithelabschnitte, bei anderen waren über 70 % des Epithels positiv. Bei Betrachtung aller 5 untersuchten Pferde entsprach dies im Mittel 30 - 70 % positiven Epithelabschnitten bezogen auf das vorhandene Riechepithel. Im Querschnitt B waren in diesem Bereich insgesamt nur noch wenige positive Zellen vorhanden.

Für die dorsalen, mittleren und ventralen Bereiche der Nasenmuscheln (Lokalisationen 2, 3 und 4) wurde im Querschnitt A meist zwischen 30 und 70 % der Epithelabschnitte als TrkA-positiv bewertet, wobei die einzelnen Werte zwischen 0 -30 % und über 70 % lagen. Im Querschnitt B ergaben sich für diese Lokalisationen ähnliche Werte, die insgesamt einer mittleren Anzahl an positiven Epithelabschnitten entsprachen. Die traf auch für den

Querschnitt C zu, wo ebenfalls meist ein mittlerer Anteil Epithelabschnitte mit positiven horizontalen Basalzellen zu finden war. Allerdings traten in den dorsalen und mittleren Bereichen erneut große Schwankungen auf. So waren teils keine positiven Abschnitte zu finden und teils machten die positiven Abschnitte mehr als 70 % des olfaktorischen Epithels aus. Im weiter rostral gelegenen Querschnitt D konnte eine deutliche Abnahme der positiven Epithelanteile verzeichnet werden. Maximal zeigten zwischen 30 und 70 % des olfaktorischen Epithels eine TrkA-spezifische Anfärbung.

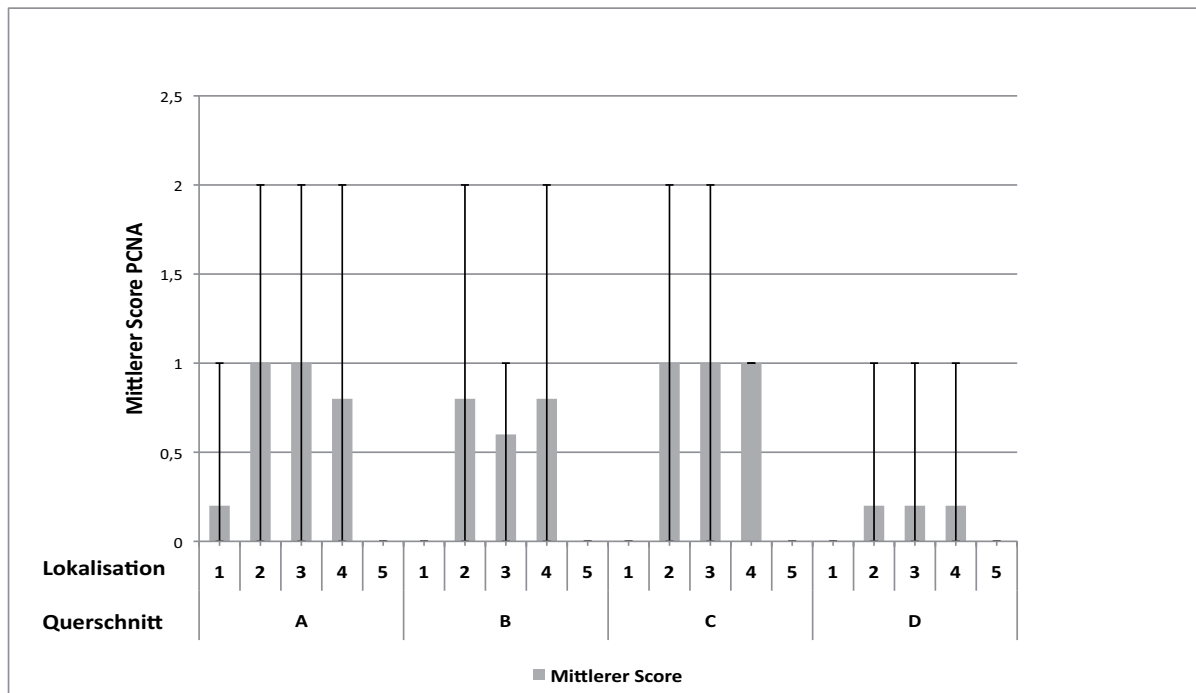
Im Bereich der Begrenzung des Cavum nasi konnten nur im Querschnitt C TrkA-positive Zellen und auch nur in geringer Anzahl gesehen werden. Eine Übersicht über den immunhistologischen Nachweis von TrkA ist in Abb. 15 zu finden. Bei fehlendem Nachweis des olfaktorischen Epithels wurde kein Score angegeben.

Abb. 13: Immunhistologie zum Nachweis von PCNA und TrkA



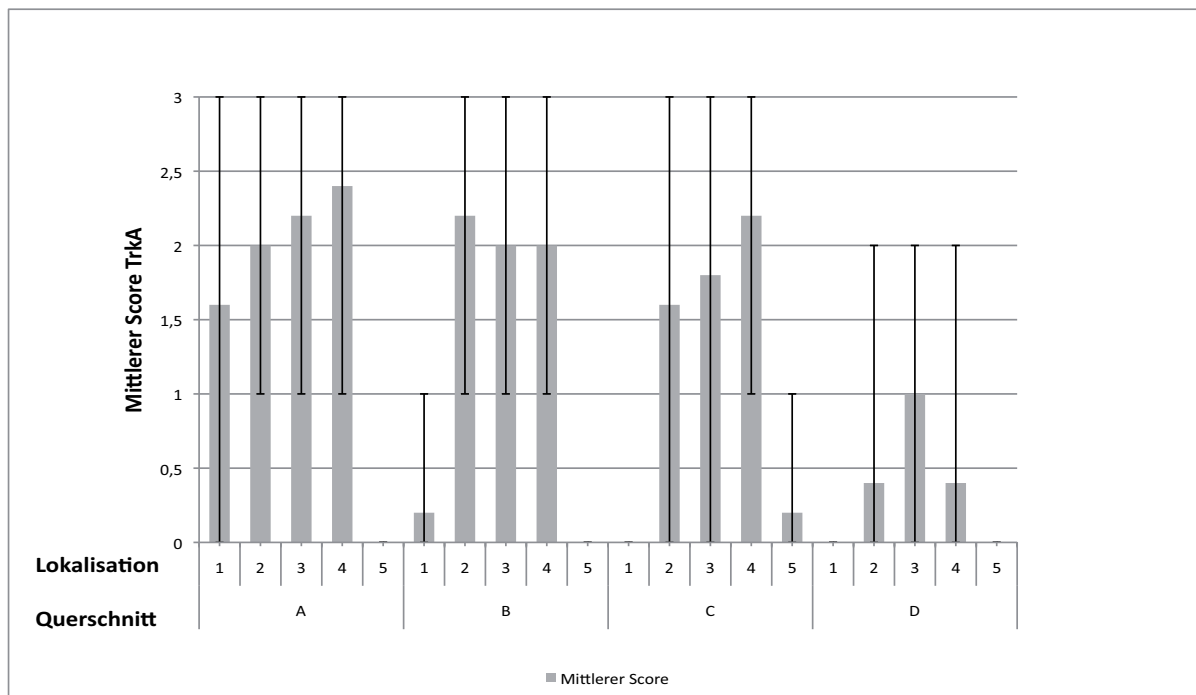
a, c: *Proliferating cell nuclear antigen* (PCNA); b, d: Tyrosinkinase-Rezeptor-A (TrkA); a, b: olfaktorisches Epithel Typ A; c, d: olfaktorisches Epithel Typ B; PB: proliferierende Basalzellen; S: Stützzellen; HB: horizontale Basalzellen; Balken: 50 μ m

Abb. 14: Immunhistologischer Nachweis von PCNA



x-Achse: Lokalisationen aufgeteilt nach Querschnitten; y-Achse: mittlerer Score für PCNA; Lokalisation 1: Nasenseptum, 2: dorsaler Anteil Nasenmuscheln, 3: mittlerer Anteil Nasenmuscheln, 4: ventraler Anteil Nasenmuscheln, 5: Begrenzung der Nasenhöhle; arithmetrischer Mittelwert; Fehlerbalken: minimaler/maximaler Wert

Abb. 15: Immunhistologischer Nachweis von TrkA



x-Achse: Lokalisationen aufgeteilt nach Querschnitten; y-Achse: mittlerer Score für TrkA; Lokalisation 1: Nasenseptum, 2: dorsaler Anteil Nasenmuscheln, 3: mittlerer Anteil Nasenmuscheln, 4: ventraler Anteil Nasenmuscheln, 5: Begrenzung der Nasenhöhle; arithmetrischer Mittelwert; Fehlerbalken: minimaler/maximaler Wert

Zur explorativen statistischen Auswertung der erhobenen Daten wurde eine dreifaktorielle Varianzanalyse der Marker OMP, DCX, PCNA und TrkA mit Messwiederholung bezüglich Querschnitt, Lokalisation und Marker durchgeführt. Hiermit sollte untersucht werden, ob die jeweils exprimierenden Zellen in bestimmten Bereichen der Pferdenase stärker vorkommen als in anderen Bereichen. Es konnte berechnet werden, dass bei globaler Betrachtung die Unterschiede in den Anteilen der positiven Epithelabschnitte am gesamten olfaktorischen Epithel sowohl zwischen den Querschnitten und den Lokalisationen (beide $p < 0,0001$) als auch zwischen den Markern ($p = 0,0037$) signifikant waren. Das bedeutet, dass die ermittelten Unterschiede im Anteil positiver Epithelabschnitte sowohl vom Querschnitt, von der Lokalisation als auch vom Marker selbst abhängig waren. Bei der Untersuchung der zweifachen Wechselwirkung konnte festgestellt werden, dass die Unterschiede im Anteil positiver Epithelabschnitte signifikant und abhängig von Querschnitt und Lokalisation ($p = 0,0010$), Querschnitt und Marker ($p = 0,0005$) sowie von Lokalisation und Marker ($p < 0,0001$) waren. Dies traf ebenfalls für die dreifache Wechselwirkung zwischen Querschnitt, Lokalisation und Marker zu ($p = 0,0027$). Die ermittelten Unterschiede in den Anteilen positiver Epithelabschnitte waren demnach abhängig davon, aus welchem Querschnitt und aus welcher Lokalisation das untersuchte Gewebe stammte sowie davon, mit welchem Marker es untersucht wurde. Insgesamt waren positive Zellen für alle Marker hauptsächlich auf den Nasenmuscheln zu finden und eine Abnahme der Expression in rostraler Richtung zu beobachten.

4.1.4 Immunhistologische Untersuchung der verschiedenen Typen des olfaktorischen Epithels

Hinsichtlich der verschiedenen Epitheltypen war festzustellen, dass, wie auch im H&E-Schnitt erkennbar, die Anzahl der adulten Neurone im Epithel Typ B deutlich geringer war als im Typ A. So waren beispielsweise bei der immunhistologischen Untersuchung der OMP-Expression in manchen Bereichen des Epithels Typ B nur 1 oder 2 Reihen von Zellkernen dunkelbraun angefärbt, wohingegen im Typ A oft mehr als 5 Schichten zu erkennen waren, die eine positive immunhistochemische Reaktion aufwiesen. Außerdem konnte häufig beobachtet werden, dass im Epithel Typ A die nukleäre Farbreaktion und im Typ B die zytoplasmatische Färbung überwog (Abb. 10b, d).

Neben der oben aufgeführten statistischen Auswertung wurde berechnet, ob eine Rangkorrelation nach Spearman zwischen Typ des olfaktorischen Epithels und Expression der immunhistologischen Marker besteht. Es sollte untersucht werden ob einer der vier Marker in einem der Epitheltypen stärker exprimiert wird.

4.1.4.1 Übergreifende statistische Auswertung

Ziel war es zu untersuchen, ob einer der vier ausgewerteten Marker häufiger in einem der beiden Typen des olfaktorischen Epithels zu detektieren war. Um einen möglichen Zusammenhang zwischen dem Anteil positiver Epithelabschnitte der vier untersuchten Marker und den Epitheltypen A und B aufzudecken, wurde der Rangkorrelationskoeffizient r_s nach Spearman berechnet. Das Ergebnis ist in Abb. 16 für jeden Marker unterteilt in die zwei Epitheltypen dargestellt. Für alle berechneten Werte konnte $p < 0,0001$ ermittelt werden, was bedeutet, dass die Ergebnisse signifikant sind.

Der stärkste Zusammenhang konnte für den OMP-Nachweis im Riechepithel Typ A mit $r_s = 0,949$ gefunden werden. Für den Typ B lag dieser Wert mit $0,846$ etwas niedriger, jedoch ist dies ebenfalls noch als starker Zusammenhang zu bewerten. Das bedeutet, dass der Nachweis adulter olfaktorischer Neurone mittels OMP besonders stark mit dem Nachweis des Epitheltyps A korreliert und mehr Abschnitte mit diesen Zellen im olfaktorischen Epithel Typ A zu finden sind als im Typ B. Folglich sind im olfaktorischen Epithel Typ A vor allem die adulten Neurone zu finden.

Ein ähnliches Bild zeigte sich bei dem Vergleich der Werte für den DCX-Nachweis und damit für den Nachweis juveniler Neurone. Der Wert r_s für den Typ A lag bei $0,879$ und für den Typ B mit $0,876$ nur minimal niedriger. Insgesamt konnte für beide Epitheltypen ein starker Zusammenhang mit dem Anteil DCX-positiver Epithelabschnitte ermittelt werden, wobei geringfügig mehr Bereiche mit unreifen olfaktorischen Neuronen im Riechepithel Typ A zu finden sind als im Typ B.

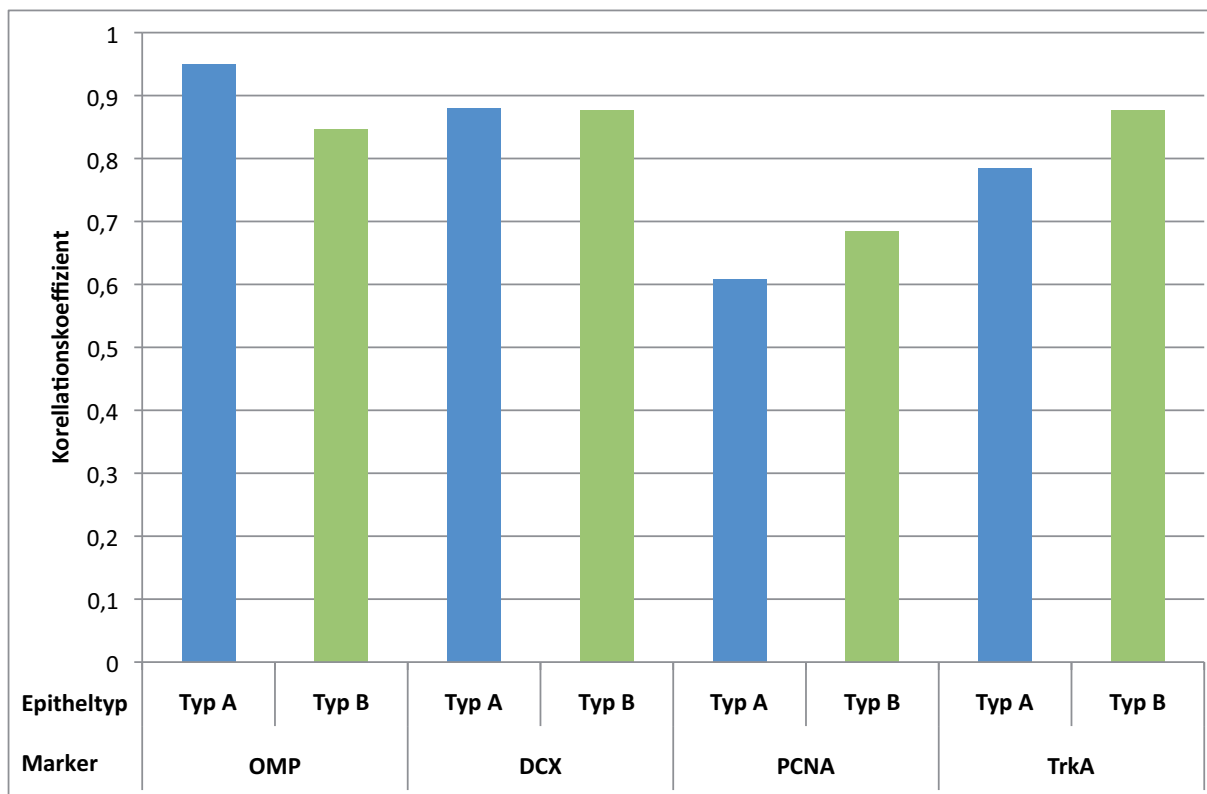
Für den Marker PCNA und den Epithetyp A lag der Rangkorrelationskoeffizient bei $0,609$. Hier kann noch von einem deutlichen Zusammenhang gesprochen werden. Der Wert für den Epitheltyp B lag mit $0,684$ etwas höher. Im Gegensatz zu den Beobachtungen bei der Expression der Marker OMP und DCX kann festgehalten werden, dass es hier eine stärkere Korrelation zwischen dem Nachweis des Markers und dem Epitheltyp B gibt, was für eine vermehrte Proliferation in diesem Bereich spricht.

Noch deutlicher konnte dieser Unterschied bei der Untersuchung der Expression des Markers TrkA herausgestellt werden. Der Wert r_s lag für das olfaktorische Epithel A bei $0,784$. Dies entspricht einem deutlichen Zusammenhang. Der Wert für den Typ B lag mit $0,876$ höher, weshalb hier von einem starken Zusammenhang bzw. einem stärkeren Zusammenhang im Vergleich zu dem Typ A gesprochen werden kann. Folglich sind in Bereichen des Epitheltyps B mehr Bereiche mit diesen Vorläuferzellen, der horizontalen Basalzellen, zu finden als in Bereichen des Epitheltyps A.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die Marker OMP und DCX im Epitheltyp A geringfügig stärker nachgewiesen werden konnten als im Typ B. Im Typ A waren also mehr

Epithelabschnitte mit adulten und juvenilen olfaktorischen Neuronen nachweisbar, wobei der Unterschied bei der OMP-Expression etwas stärker ausgeprägt war als beim Nachweis von DCX. Hinsichtlich der Marker PCNA und TrkA zeigte sich das umgekehrte Bild. Der Nachweis war in beiden Fällen im Epitheltyp B stärker. Das bedeutet, dass es in diesem Epitheltyp mehr proliferierende und horizontale Basalzellen bzw. mehr Epithelabschnitte mit diesen Zelltypen gab, was auf eine stärkere Proliferation dieses Epitheltyps hinweisen kann.

Abb. 16: Rangkorrelationskoeffizient nach Spearman für die Expression der immunhistologischen Marker im Bezug auf die Epitheltypen



x-Achse: Marker und Epitheltyp; y-Achse: Rangkorrelationskoeffizient

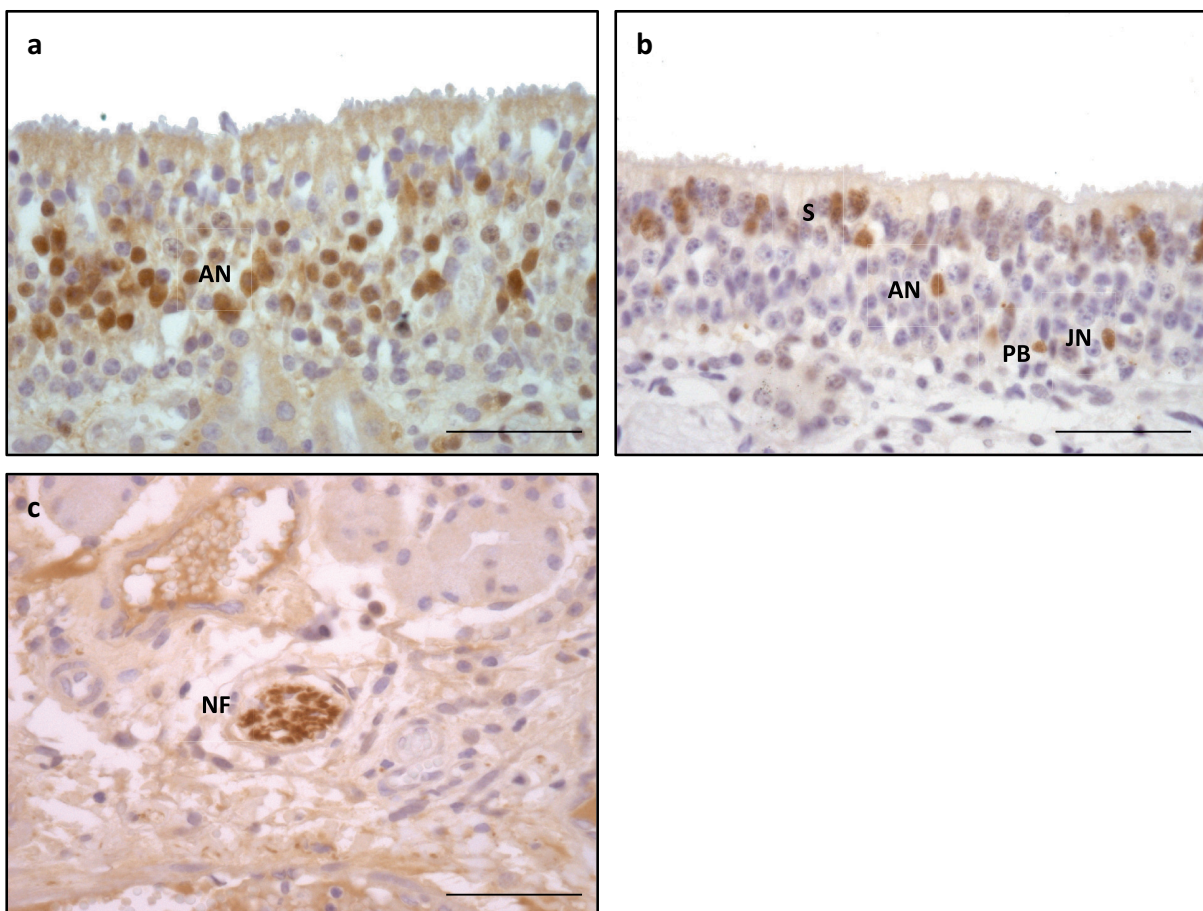
4.1.4.2 Weitere immunhistologische Marker

Als weitere Marker zur Darstellung der Neurone des Riechepithels wurden die neuronenspezifische Enolase (NSE), *Neuronal nuclei* (NeuN) und Tyrosinhydroxylase (TH) an ausgewählten Gewebeschnitten etabliert und getestet.

NSE konnte im Riechepithel des Pferdes als braune Anfärbung der Zellkerne im mittleren Drittel des Epithels nachgewiesen werden (Abb. 17a). Diese war feingranulär bis diffus, betraf jedoch nicht alle Zellkerne, die in diesem Bereich vorhanden waren. Dies steht im Gegensatz zu der Expression von OMP (Abb. 10). Von der Lokalisation und Morphologie abgeleitet, handelte es sich bei den angefärbten Zellkernen um die Kerne der adulten

olfaktorischen Neuronen. Eine zytoplasmatische Anfärbung konnte nicht beobachtet werden. Dies steht im Gegensatz zu dem für Ratte und Maus beschriebenen zytoplasmatischen Färbemuster. Lediglich bei sehr jungen Tieren ist bekannt, dass eine Färbung des Kerns auftreten kann (WEILER und BENALI, 2005). NeuN war ebenfalls im Zellkern innerhalb des olfaktorischen Epithels nachweisbar. Auffallend war hierbei allerdings, dass nicht nur eine Zellpopulation NeuN exprimiert. Die dunkelbraune, feingranuläre bis diffuse Reaktion war in allen Zonen des Epithels, sowohl apikal, im mittleren Bereich als auch basal zu finden. Anhand der Lokalisation und der Morphologie schienen neben den Neuronen der unterschiedlichen Altersstufen auch teils Kerne von Stützzellen und Vorläuferzellen angefärbt worden zu sein (Abb. 17b). TH eignete sich gut zur Darstellung der in der Lamina propria gelegenen Nervenfasern, die die Funktion eines Bindeglieds zwischen den sensorischen Neuronen des Epithels und dem Bulbus olfactorius einnehmen. Je nachdem, ob die Nervenfasern im Längs- oder Querschnitt getroffen waren, war TH als eine streifenförmige Anfärbung der Nervenfasern zu erkennen (Abb. 17c).

Abb. 17: Immunhistologischer Nachweis von NSE, NeuN und TH



a: neuronenspezifische Enolase (NSE); b: *neuronal nuclei* (NeuN); c: Tyrosinhydroxylase (TH); AN: adulte Neurone; JN: juvenile Neurone; S: Stützzellen; PB: proliferierende Basalzellen; NF: Nervenfasern; Balken: 50 μ m

4.1.5 Vergleichende immunhistologische Untersuchung des olfaktorischen Epithels der Ratte

Zur Untersuchung der Rattennase konnte zur Darstellung der Expression des *Olfactory marker proteins* (OMP) auf das unveränderte Protokoll des Pferdes zurückgegriffen werden. Das Expressionsmuster entsprach dem des Pferdes. In der mittleren Schicht des Riechepithels, die den adulten Neuronen entspricht, zeigten sich die Kerne und zum Teil auch der apikale Teil des Zytoplasmas bzw. der Dendrit angefärbt.

Doublecortin (DCX) wurde ebenfalls in beiden Spezies von gleichen Zellpopulationen exprimiert. Hier war DCX in Kernen der unreifen Neurone, die anhand ihrer Morphologie und Lage erkennbar waren, in beiden Spezies zu finden. Es konnte ebenso in ausgedehnten Bereichen der Dendrit der Nervenzelle durch seine braune Färbung in Richtung der apikalen Epitheloberfläche verfolgt werden.

Proliferating cell nuclear antigen (PCNA) wurde, bezogen auf das Reaktionsmuster, in beiden Spezies ebenfalls gleichermaßen exprimiert. In einigen Arealen des Epithels war PCNA in Zellkernen der proliferierenden Basalzellen oder der Kerne der Stützzellen nachweisbar. Insgesamt wurden bei der Ratte jedoch mehr Zellen pro Epithelabschnitt und auch mehr Epithelabschnitte markiert, was auf eine stärkere Proliferation des Epithels bei der Ratte hinweisen kann.

Tyrosinkinase-Rezeptor-A (TrkA) war nur im olfaktorischen Epithel des Pferdes detektierbar. Nur in sehr kleinen Abschnitten der oralen Mukosa war bei der Ratte TrkA zu beobachten, wie es für das Riechepithel zu erwarten gewesen wäre.

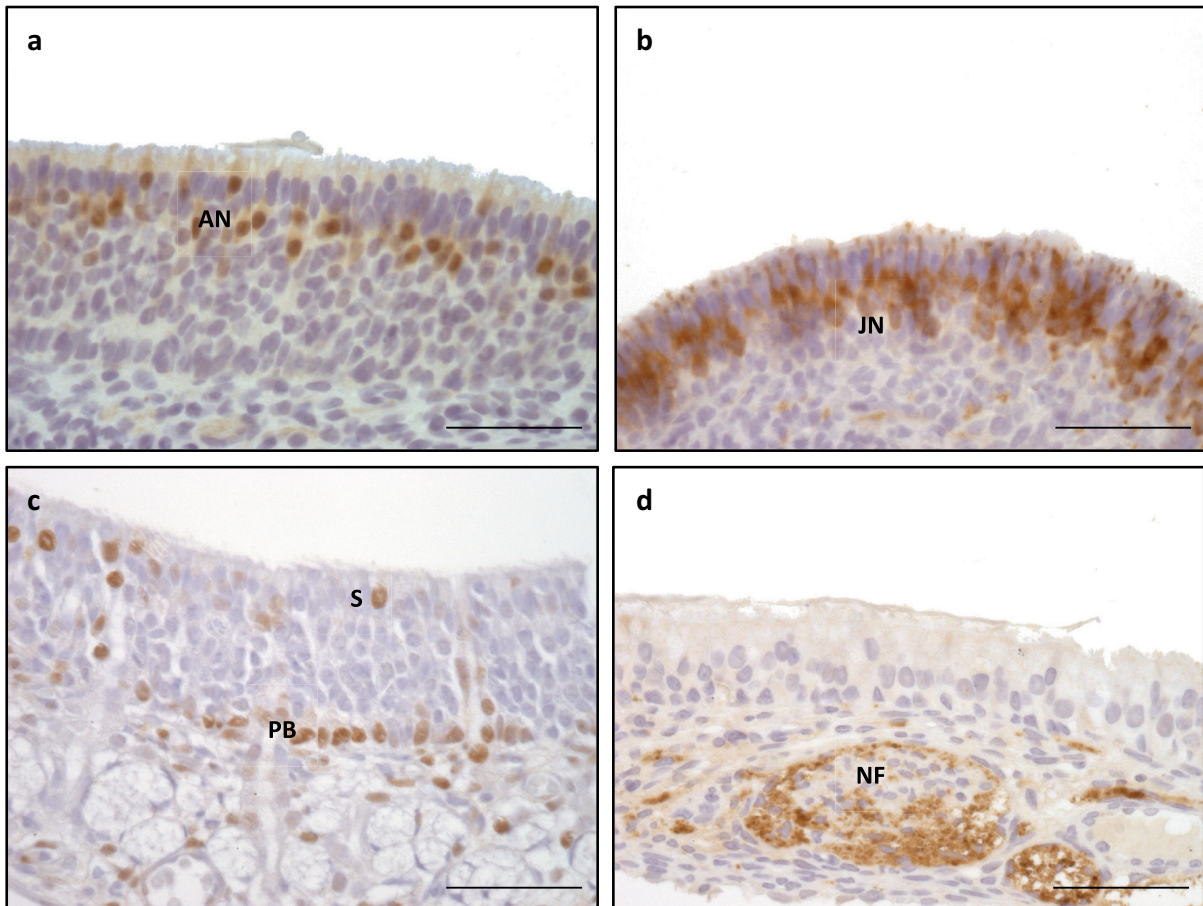
Neuronenspezifische Enolase (NSE) war beim Pferd größtenteils intranukleär exprimiert. Bei der Ratte war NSE mit den zur Verfügung stehenden Antikörpern nicht nachzuweisen.

Die Expression von NeuN lieferte widersprüchliche Ergebnisse im Speziesvergleich. Während NeuN beim Pferd in Kernen einiger adulte und juvenile Neurone zu detektieren war, waren bei der Ratte nur ganz feine einzelne Dendriten der Nervenzellen NeuN positiv, die in Richtung Nasenhöhle ragten. Die typische intranukleäre Expression fehlte jedoch.

Tyrosinhydroxylase wurde in beiden Spezies vergleichbar exprimiert. In den Nervenfasern, die unterhalb des Epithels in der Lamina propria zu finden waren, konnte regelmäßig eine granuläre mittelbraune Färbung dargestellt werden.

In der Abb. 18 sind die immunhistologischen Marker OMP, DCX, PCNA und TH im olfaktorischen Epithel der Ratte dargestellt.

Abb. 18: Immunhistologischer Nachweis von OMP, DCX, PCNA und TH im olfaktorischen Epithel der Ratte



a: Olfactory marker protein; b: Doublecortin; c: Proliferating cell nuclear antigen (PCNA); d: Tyrosinhydroxylase (TH); AN: adulte olfaktorische Neurone; JN: juvenile olfaktorische Neurone; PB: proliferierende Basalzellen; S: Stützzellen; Balken: 50 µm

4.2 EXPERIMENTELLE INTRANASALE BDV-INFEKTION VON LEWIS-RATTEN

4.2.1 Klinik

Während des untersuchten Zeitraums von 3 Stunden *post infection* (hpi) bis 21 Tagen *post infection* (dpi) nach der intranasalen Infektion der adulten Lewis-Ratten zeigte keines der Tiere neurologische Störungen. Auch unspezifische Symptome, die auf eine Erkrankung hätten hinweisen können, wie beispielsweise eine fehlende Gewichtszunahme oder Veränderungen des Haarkleides, konnten nicht beobachtet werden. Das Gleiche galt auch für die Mock-infizierten Kontrolltiere. Dies wurde in den Score Sheets für jedes einzelne Tier dokumentiert. Über den gesamten Versuchszeitraum war eine tägliche Adspektion gewährleistet. Zusätzlich wurde jedes Tier bis zu dem Zeitpunkt 14 dpi alle 3 - 4 Tage und ab diesem Zeitpunkt jeden zweiten Tag eingehend klinisch untersucht.

4.2.2 Histopathologische Befunde

Zur histopathologischen Untersuchung der Versuchstiere und der Mock-infizierten Kontrolltiere wurden von den gewonnenen Geweben aus dem ZNS und der Nase H&E-Schnitte angefertigt und untersucht. In keinem der untersuchten Gewebe fanden sich histologische Veränderungen, die auf ein entzündliches Geschehen hätten hinweisen können. Nekrosen oder andere degenerative Veränderungen lagen ebenfalls nicht vor. Auch zwischen den Mock-infizierten Kontrolltieren und BDV-infizierten Tieren konnten keine histologisch erkennbaren Unterschiede festgestellt werden.

4.2.3 Immunhistologischer Nachweis von BDV-N

Das Vorhandensein von BDV-N in Nase und Gehirn wurde nach 3, 18 und 24 Stunden, sowie nach 2, 4, 7, 14 und 21 Tagen nach der intranasalen Infektion untersucht. Pro Untersuchungszeitpunkt wurden je 5 Nasenhälften der infizierten Tiere bzw. je 2 Nasenhälften bei dem Untersuchungszeitpunkt 21 dpi und bei allen Mock-infizierten Tieren ausgewertet (Tab. 8).

Grundsätzlich konnte in der immunhistologischen Untersuchung zwischen einer nukleären und einer zytoplasmatischen Reaktion unterschieden werden. Die nukleäre Reaktion zeigte sich meist als fleckige bis diffuse braune Farbreaktion in den Zellkernen der unterschiedlichen Zelltypen des olfaktorischen Epithels. Die zytoplasmatische Reaktion war ebenfalls durch eine fleckige bis meist diffuse Braunfärbung in der perinukleären Region, im Axon oder im Dendrit gekennzeichnet. In der Regel konnte sie zusammen mit einer Kernreaktion derselben Zelle vorgefunden werden. Abhängig vom Zeitverlauf fand sich BDV-N nicht nur in den reifen Neuronen, sondern auch in den Vorläuferzellen. Sowohl in juvenilen Neuronen, die weiter basal als die adulten Neurone liegen, als auch beide Typen der Basalzellen konnte, je nach dpi, BDV-N nachgewiesen werden. In der Lamina propria war BDV-N in den dort vorhandenen Nervenfaserbündeln zu finden. Daneben war BDV-N auch in den olfaktorischen Hüllzellen nachweisbar. Das Reaktionsmuster entsprach dem der Zellen des olfaktorischen Epithels. So konnte eine deutliche braune Färbung der Kerne und Zellfortsätze dieses Zelltyps um die Nervenfasern herum und zwischen die Fasern ziehend beobachtet werden.

Das zelluläre Reaktionsmuster der BDV-infizierten Gehirnzellen entsprach dem der Zellen des olfaktorischen Epithels. Es ließ sich zwischen einer nukleären und einer zytoplasmatischen Reaktion unterscheiden. Die nukleäre Reaktion stellte sich meist als granuläre bis grobschollige und zum Teil auch diffuse Anfärbung des Zellkerns dar. Die zytoplasmatische Reaktion war meist durch eine diffuse Braunfärbung gekennzeichnet.

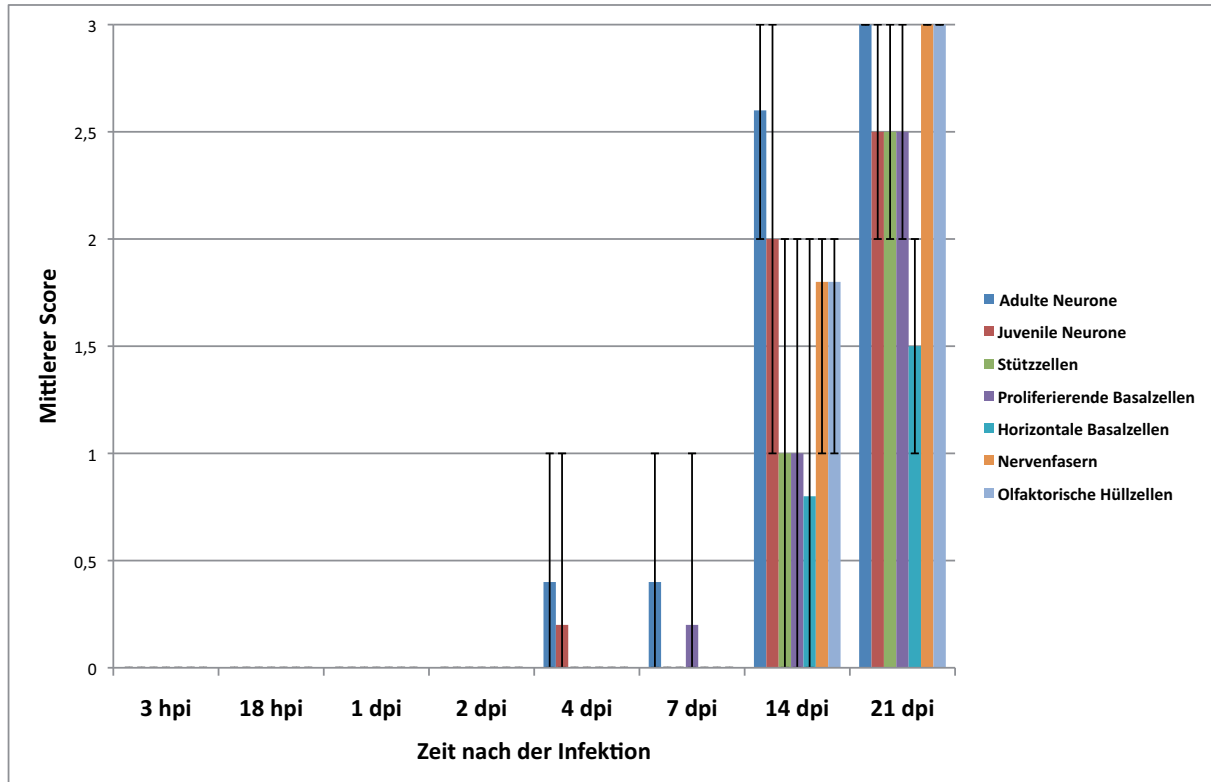
Dieses immunhistologische Reaktionsmuster war in Neuronen, Astrozyten und Ependymzellen zu beobachten. Gleichzeitig konnte im Gehirn BDV-N im Neuropil nachgewiesen werden. Die entsprechende Farbreaktion stellte sich als eine feingranuläre Anfärbung des Neuropils dar und war meist um Zellansammlungen zu finden von denen sie strahlenförmig auslief.

4.2.3.1 Kinetik des Nachweises von BDV-N in der Nase

Bei keinem der Versuchstiere war im olfaktorischen Epithel 3, 18, 24 und 48 Stunden nach der intranasalen Infektion BDV-N nachweisbar. 4 Tage nach der Infektion konnte in 2 der 5 Ratten BDV-N in einzelnen reifen olfaktorischen Neuronen detektiert werden (Abb. 19, Abb. 20a). Bei einem Tier konnte zusätzlich BDV-N in einzelnen unreifen olfaktorischen Neuronen dargestellt werden. 7 Tage nach der Infektion war ebenfalls in 2 von 5 Ratten BDV-N in einzelnen adulten olfaktorischen Neuronen nachweisbar. Erstmals war auch in proliferierenden Basalzellen BDV-N nachweisbar (Abb. 19, Abb. 20b). 14 Tage nach der Infektion war in allen 5 untersuchten Ratten BDV-N in den adulten olfaktorischen Neuronen nachweisbar. Mit mindestens 10, meist jedoch sogar mit mindestens 60 positiven Zellen pro Gewebeschnitt bei allen untersuchten Ratten, war eine deutliche Ausbreitung der BDV-Infektion zu finden. Ebenso war bei allen untersuchten Ratten BDV-N in unreifen Neuronen zu finden, meist jedoch in weniger Zellen als in den adulten olfaktorischen Neuronen. In jeweils 3 von 5 Tieren konnte in den Stützzellen und in den proliferierenden Basalzellen BDV-N nachgewiesen werden, wobei die maximale Zahl und der Durchschnitt der positiven Zellen geringer war als bei den juvenilen olfaktorischen Neuronen. In einzelnen horizontalen Basalzellen fand sich zu diesem Untersuchungszeitpunkt in 2 von 5 Tieren BDV-N. Bei allen Tieren war 14 dpi sowohl in den Nervenfasern als auch in den olfaktorischen Hüllzellen (*olfactory ensheathing cells*, OECs) BDV-N nachweisbar, wobei der Nachweis stets in einzelnen, meist aber in 10 bis 60 Zellen bzw. Nervenfasern pro Gewebeschnitt gelang (Abb. 20; Abb. 19c, d). 21 Tage p.i. war bei allen untersuchten Tieren in allen Zelltypen bzw. in den Nervenfasern unterhalb des Riechepithels BDV-N in vielen Zellen nachweisbar. Vor allem in den adulten olfaktorischen Neuronen, in den Nervenfasern und in den olfaktorischen Hüllzellen waren stets weit über 60 Zellen bzw. Nervenfasern pro Gewebeschnitt positiv. Die Anzahl BDV-N positiver juveniler Neurone, Stützzellen und proliferierender Basalzellen war etwas geringer. Lediglich bei den horizontalen Basalzellen war in deutlich weniger Zellen BDV-N zu finden, da in einem Tier für diesen Zelltyp lediglich bis zu 10 positive Zellen auf dem gesamten Schnitt gefunden werden konnten. Während in den Untersuchungszeitpunkten bis 7 dpi sowohl viele einzelne positive Zellen als auch kleinere

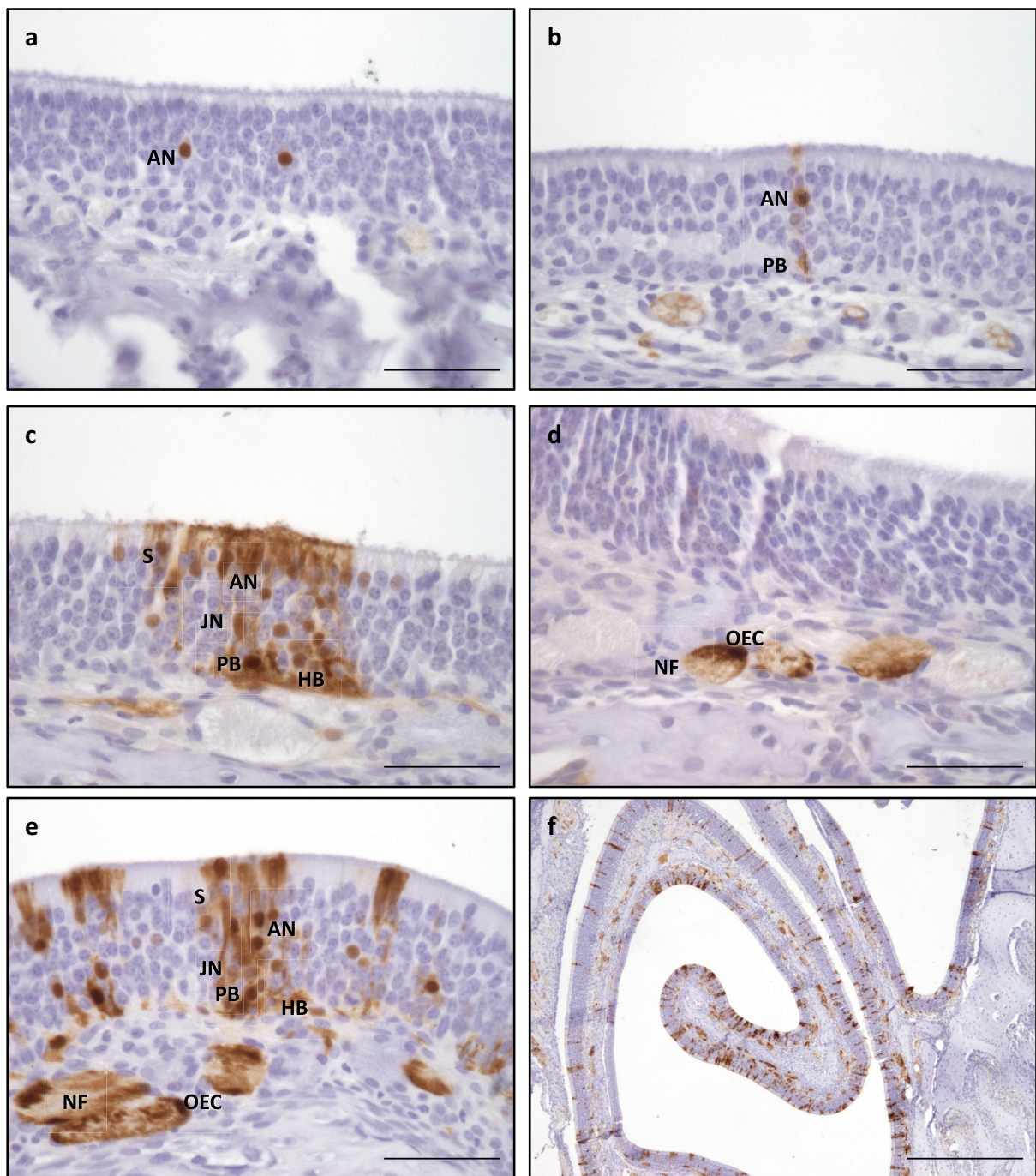
Nester positiver Zellen auf dem Gewebeschnitt zu finden waren, dominierten ab 14 dpi BDV-N-positive Zellherde.

Abb. 19: Nachweis von BDV-N im olfaktorischen Epithel nach intranasaler Infektion von Lewis-Ratten



x-Achse: Untersuchungszeitpunkte; y-Achse: mittlerer Score für den Nachweis von BDV-N in den jeweiligen Zelltypen; hpi: *hours post infection* dpi: *days post infection*; arithmetrischer Mittelwert; Fehlerbalken: minimaler/maximaler Wert

Abb. 20: Immunhistologischer Nachweis von BDV-N im olfaktorischen Epithel



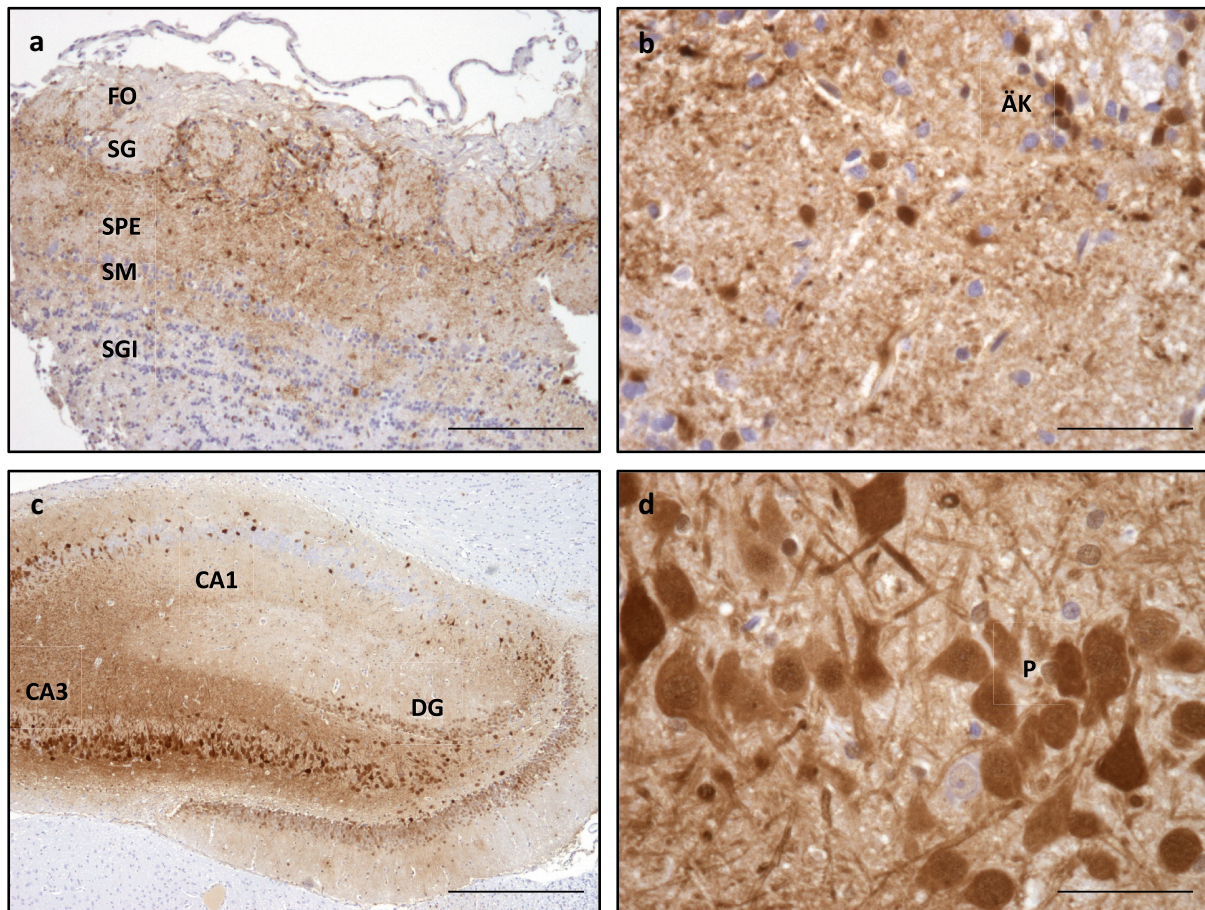
a: 4 dpi; b: 7 dpi; c, d: 14 dpi; e, f: 21 dpi; AN: adulte Neurone; JN: juvenile Neurone; PB: proliferierende Basalzellen; HB: horizontale Basalzellen; NF: Nervenfasern; OEC: olfaktorische Hüllzellen; Balken a - e: 50 µm, f: 500 µm

4.2.3.2 Nachweis von BDV-N im Gehirn

BDV-N war erstmals 14 Tage nach der Infektion immunhistologisch im Gehirn zu erkennen. Der Nachweis von BDV-N entsprach in seinem Reaktionsmuster der Beschreibung unter 4.2.3.1. BDV-N war in verschiedenen Zelltypen sowohl im Nukleus als auch im Zytoplasma

detektierbar. Außerdem lag eine ausgeprägte Anfärbung des Neuropils vor. BDV-N war zu diesem Zeitpunkt vornehmlich in den rostralen Anteilen des Gehirns, inklusive des Bulbus olfactorius, zu beobachten (Abb. 21a, b). BDV-N konnte jedoch bereits in einzelnen Zellen im Ammonshorn detektiert werden. 21 Tage nach der Infektion war BDV-N in allen Gehirntarealen BDV-N in vielen Zellen zu finden (Abb. 21c, d).

Abb. 21: Immunhistologischer Nachweis von BDV-N im Gehirn



a, b: Bulbus olfactorius, 14 dpi; c, d: Ammonshorn, 21 dpi; FO: Fila olfactoria; SG: Stratum glomerulosum mit Stratum granulosum externum; SPE: Stratum plexiforme externum; SM: Stratum mitrale; SGI: Stratum granulosum internum; ÄK: äußere Körnerzellschicht; CA1: CA1-Region; CA3: CA3-Region; DG: Gyrus dentatus; P: Pyramidenzellen; Balken: a: 200 µm; b, d: 50 µm; c: 500 µm

4.2.3.3 Negativkontrollen der Immunhistologie

Zu keinem Zeitpunkt der durchgeführten Versuche war BDV-N in den Mock-infizierten Tieren nachweisbar.

4.2.4 Nachweis von BDV-N mRNA und genomischer RNA mittels *In-situ*-Hybridisierung

Die *In-situ*-Hybridisierung zum Nachweis von BDV-N mRNA bzw. genomischer RNA wurde an dem aus der Nase gewonnenen Gewebe zu den Untersuchungszeitpunkten 3, 18 und 24

Stunden nach der Infektion (hpi), sowie 2, 4, 7, 10, 14 und 21 Tagen nach der Infektion (dpi) bei allen infizierten Ratten und bei je einer Mock-infizierten Ratten zu den Zeitpunkten 1 und 14 dpi (Tab. 8) durchgeführt. Zusätzlich wurde diese Untersuchung an den Gehirnen der Versuchstiere zu den Untersuchungszeitpunkte 18 hpi sowie 7, 4 und 14 dpi (Tab. 8) sowie bei je einer Mock-infizierten Ratte 1 und 14 dpi durchgeführt, um zu untersuchen, ob virale RNA oder mRNA zu früheren Zeitpunkten als virales Antigen nachweisbar war.

4.2.4.1 Reaktionsmuster der In-situ-Hybridisierung

Das zelluläre Reaktionsmuster des Nachweises viraler mRNA und genomischer RNA mittels *In-situ*-Hybridisierung ähnelte dem Reaktionsmuster des immunhistologischen Nachweises von BDV-N.

Nachweis der genomischen RNA

Genomische Virus-RNA war ausschließlich im Zellkern zu finden. Zu frühen Untersuchungszeitpunkten waren einzelne oder mehrere dunkelblaue bis schwarze Granula innerhalb des Kerns zu finden. Zu späten Untersuchungszeitpunkten war eine nahezu diffuses Signal im Zellkern detektierbar. Insgesamt überwog im Gegensatz zum Nachweis von BDV-N, wo meist eine fleckige bis diffuse Anfärbung des Kerns beobachtet werden konnte, die granuläre Kernreaktion.

Nachweis der BDV-N mRNA

BDV-N mRNA war in der Regel als zytoplasmatische Farbreaktion nachweisbar. Diese zeigte sich als granuläres bis meist diffuses dunkelblaues, perinukleäres zytoplasmatisches Signal sowie als Signal in den Zellfortsätzen. Außerdem war in einigen Zellen zusätzlich eine grobe, granuläre bis diffuse Anfärbung des Zellkerns zu beobachten. Zu frühen Untersuchungszeitpunkten (4 dpi) lag eine granuläre Anfärbung des Zellkerns ohne zytoplasmatische Reaktion vor.

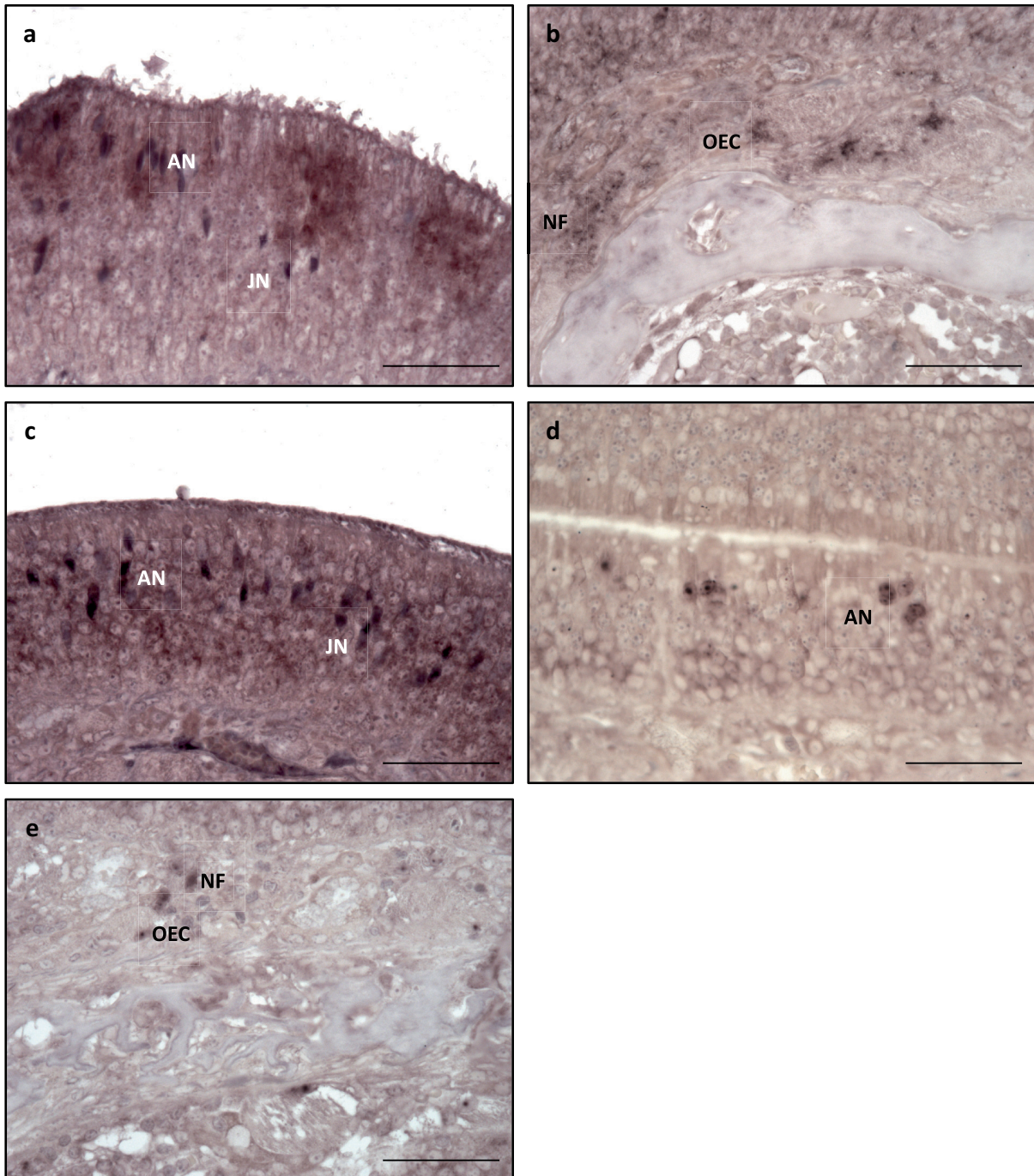
4.2.4.2 Kinetik des Nachweises von BDV-N mRNA und viraler genomischer RNA im olfaktorischen Epithel

Nachweis der genomischen RNA

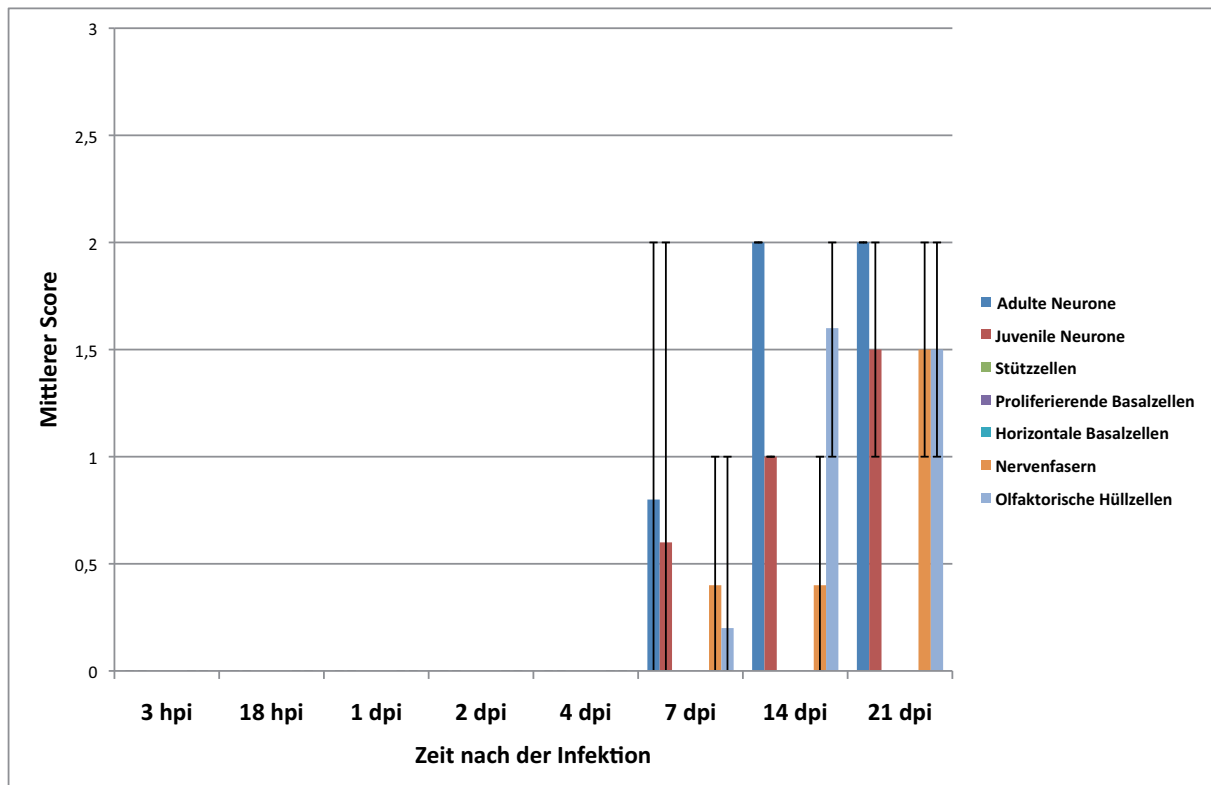
In der Nase war genomische RNA erstmals 7 Tage nach der Infektion nachweisbar. Dies war in 3 von 5 Ratten in einzelnen adulten Neuronen oder in einer mittleren Menge dieser Zellen möglich. Zu diesem Untersuchungszeitpunkt war auch in den unreifen Riechnervenzellen in 2 Tieren genomische RNA nachweisbar, wobei der Nachweis in diesen Tieren in geringer und in mittlerer Zahl der Zellen gelang (Abb. 22a, Abb. 23). In 2 Tieren konnte außerdem,

wenn auch nur in einzelnen Bereichen, virale RNA in den Nervenfasern nachgewiesen werden (Abb. 22b, Abb. 23). In einem Tier fand sich außerdem genomische RNA in den olfaktorischen Hüllzellen, jedoch nur in wenigen Zellen (<10). 14 Tage nach der Infektion fand sich in allen untersuchten Tieren genomische RNA in reifen und unreifen olfaktorischen Neuronen sowie in den OECs (Abb. 22c, Abb. 23). Bei den reifen Neuronen wurde stets zwischen 10 und 60 positive Zellen gefunden, bei den unreifen Neuronen nur bis zu 10. Bei den OECs war ebenfalls in weniger als 60 Zellen genomische virale RNA nachweisbar, im Durchschnitt waren jedoch etwas weniger Zellen positiv als bei den reifen olfaktorischen Neuronen. In 2 Tieren war genomische RNA auch in einzelnen Nervenfasern auffindbar. 21 Tage nach der Infektion konnte in beiden der untersuchten Ratten genomische RNA in den reifen und unreifen olfaktorischen Neuronen sowie in den Nervenfasern und in den olfaktorischen Hüllzellen gefunden werden. Während bei beiden Tieren immer zwischen 10 und 60 adulte Neurone positiv waren, fanden sich bei einem Tier nur einzelne positive juvenile Neurone, Nervenfasern und olfaktorische Hüllzellen (Abb. 22d, e; Abb. 23). Somit war 14 und 21 dpi eine deutliche Zunahme von herdförmigen Bereichen mit positiven Zellen zu beobachten. Zu keinem der Untersuchungszeitpunkte war mittels *In-situ*-Hybridisierung genomische RNA in den Stützzellen sowie den proliferierenden und horizontalen Basalzellen nachweisbar. Auch in anderen Zellen des respiratorischen Epithels war nie genomische virale RNA detektierbar.

Abb. 22: *In-situ*-Hybridisierung zum Nachweis viraler genomischer RNA im olfaktorischen Epithel



a: adulte und juvenile Neurone, 7 dpi; b: OECs und Nervenfasern in der Lamina propria, 7 dpi; c: adulte und juvenile Neurone, 14 dpi; d: adulte Neurone, 21 dpi; e: OECs und Nervenfasern in der Lamina propria, 21 dpi; AN: adulte Neurone; JN: juvenile Neurone; NF: Nervenfasern; OEC: olfaktorische Hüllzellen; Balken: 50 μ m

Abb. 23: Nachweise der genomischen RNA im olfaktorischen Epithel

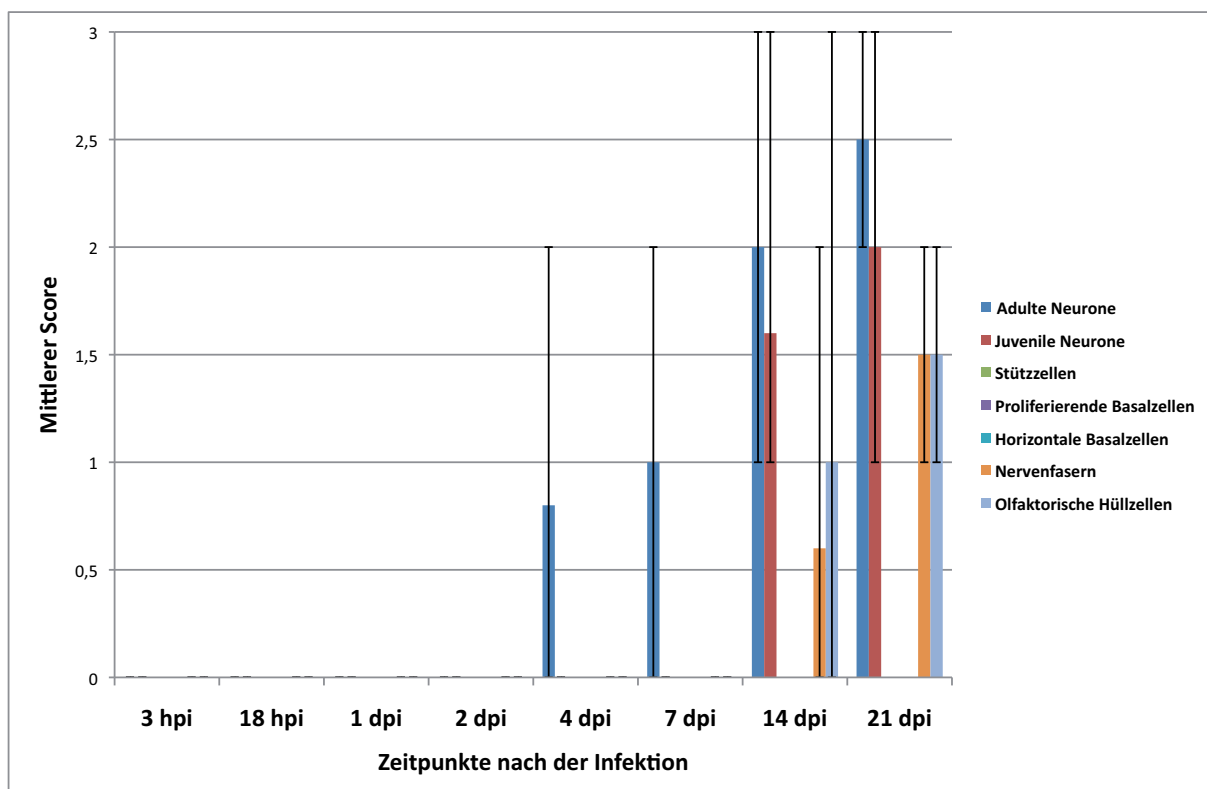
x-Achse: Untersuchungszeitpunkte; y-Achse: mittlerer Score für den Nachweis der genomischen RNA (gRNA) in den jeweiligen Zelltypen; hpi: *hours post infection* dpi: *days post infection*; arithmetrischer Mittelwert; Fehlerbalken: minimaler/maximaler Wert

Nachweis der BDV-N mRNA

BDV-N mRNA konnte erstmals 4 Tage nach der intranasalen Infektion bei 2 von 5 untersuchten Tieren in mittlerer Anzahl in reifen olfaktorischen Neuronen nachgewiesen werden. Diese fand sich jedoch zu diesem Zeitpunkt vornehmlich im Zellkern und nicht im Zytoplasma (Abb. 25; Abb. 24a). 7 Tage nach der Infektion war bereits bei 4 von 5 Tieren BDV-N mRNA in den adulten Neuronen zu finden, wobei, wie auch 4 Tage nach der Infektion, maximal zwischen 10 und 60 Zellen positiv waren. Auch hier war, neben einer leichten zytoplasmatischen Färbung, eine Färbung des Zellkerns erkennbar (Abb. 25; Abb. 24b). 14 Tage nach der Infektion war bei allen 5 infizierten Ratten mRNA in den reifen und in den unreifen Neuronen detektierbar. Auffallend war eine meist herdförmige Verteilung der positiven Zellen. Die Zahl der positiven Zellen variierte zwischen einzelnen und mehr als 60 auf dem Gewebeschnitt, wobei insgesamt die Zahl der positiven adulten Neurone geringfügig höher lag als die der juvenilen Neurone. Außerdem waren mehr positive Zellen als in vorherigen Zeitpunkten zu finden (Abb. 25; Abb. 24c). In den Nervenfasern und in den OECs war zu diesem Untersuchungszeitpunkt mRNA bei 2 der 5 Tiere nachweisbar. Bei den Nervenfasern fand sich höchstens eine mittlere Zahl positiver Fasern, wohingegen bei den OECs auch mehr als 60 positive Zellen vorlagen. 21 Tage nach der Infektion war bei den

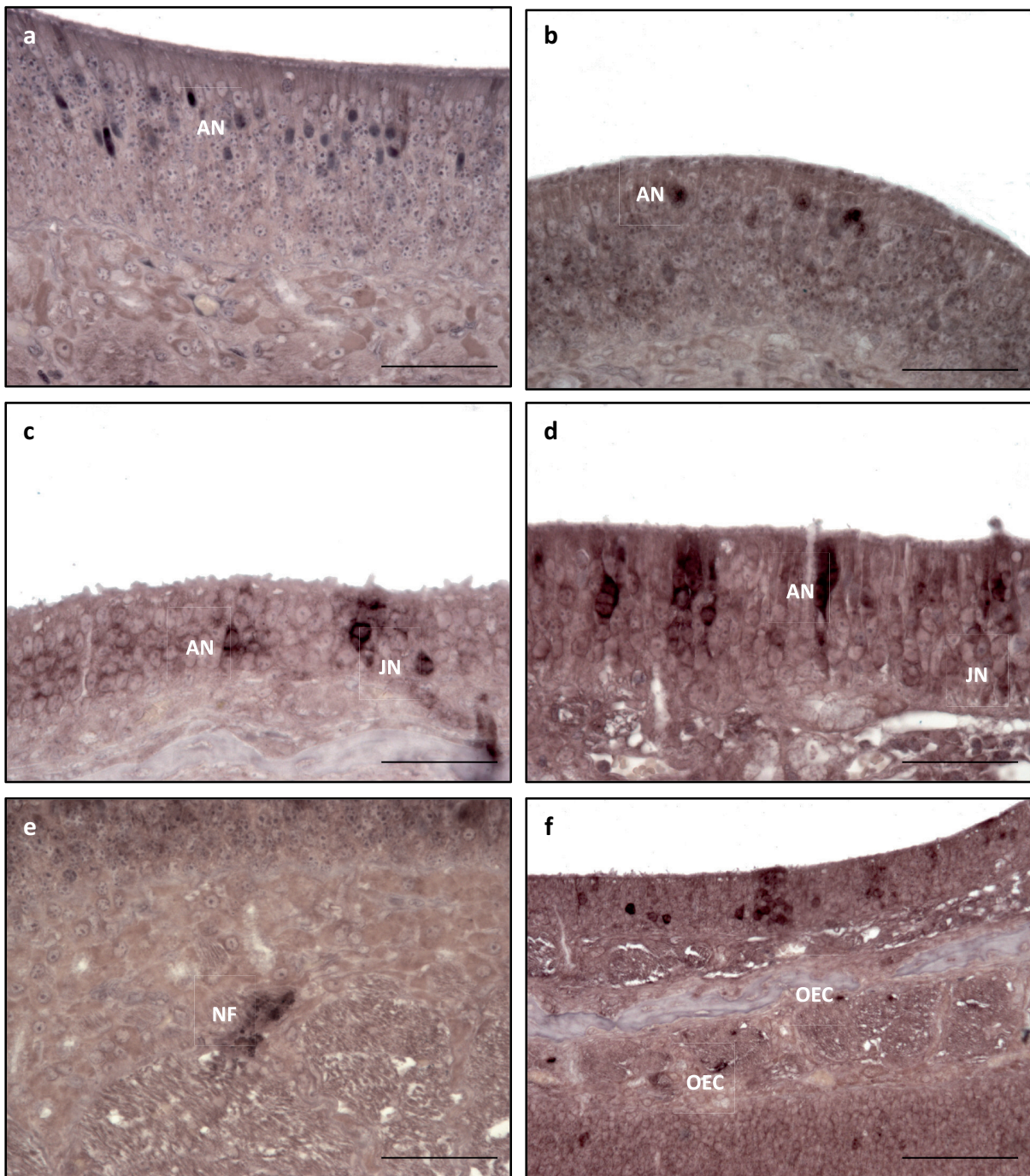
beiden untersuchten Ratten jeweils in den reifen und unreifen Neuronen sowie in den Nervenfasern und in den OECs BDV-N mRNA nachweisbar. Bei den adulten Neuronen fand sich eine mittlere oder hohe Zahl positiver Zellen, bei den unreifen Neuronen waren in einem Tier nur einzelne positive Zellen detektierbar, weshalb im Durchschnitt etwas weniger juvenile als adulte Neuronen positiv waren (Abb. 25; Abb. 24d). Sowohl in den Nervenfasern als auch in den OECs fanden sich entweder nur einzelne oder zwischen 10 und 60 positive Zellen auf dem Gewebeschnitt (Abb. 25e, f). Auch 21 dpi dominierte das herdförmige Verteilungsmuster. Insgesamt wurde demnach eine Zunahme positiver Zellen über die Zeit beobachtet. Außer in den benannten Zellen wurde keine BDV-N mRNA in anderen Zelltypen oder in anderen Epithelien der Nase nachgewiesen.

Abb. 24: Nachweise BDV-N mRNA im olfaktorischen Epithel



x-Achse: Untersuchungszeitpunkte; y-Achse: mittlerer Score für den Nachweis der BDV-N mRNA in den jeweiligen Zelltypen; hpi: *hours post infection* dpi: *days post infection*; arithmetrischer Mittelwert; Fehlerbalken: minimaler/maximaler Wert

Abb. 25: *In-situ*-Hybridisierung zum Nachweis BDV-N mRNA im olfaktorischen Epithel



a: adulte Neurone, 4 dpi; b: adulte Neurone, 7 dpi; c: adulte und juvenile Neurone, 14 dpi; d: adulte und juvenile Neurone, 21 dpi; e: Nervenfasern in der Lamina propria, 21 dpi; f: adulte und juvenile Neurone, OECs in der Lamina propria, 21 dpi; AN: adulte Neurone; JN: juvenile Neurone; NF: Nervenfasern; OEC: olfaktorische Hüllzellen; Balken a - e: 50 µm, f: 100 µm

4.2.4.3 Nachweis von viraler genomischer RNA und BDV-N mRNA im Gehirn

Um zu untersuchen, ob bei einer BDV-Infektion genomische und mRNA schon früher als virales Antigen im Gehirn nachweisbar war, wurde vom Gehirn der je 5 Ratten zu den ausgewählten Untersuchungszeitpunkten 18 hpi sowie 4, 7 und 14 dpi eine *In-situ*-

Hybridisierung durchgeführt. Zu keinem dieser Zeitpunkte war virale genomische RNA oder BDV-N mRNA in den untersuchten Gehirnarealen nachweisbar.

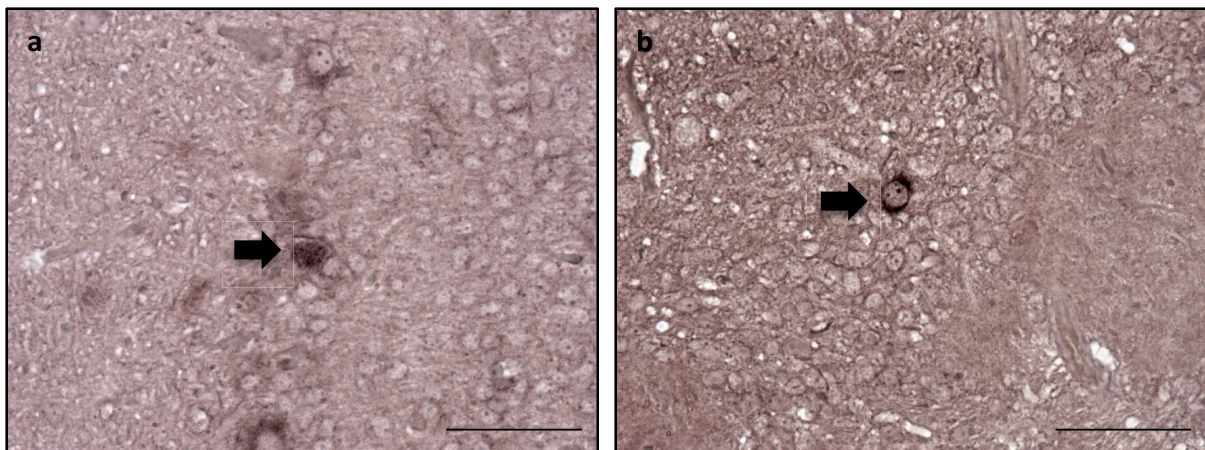
Genomische RNA

Genomische RNA war, wie virales Antigen (4.2.3.3), erstmalig 14 Tage nach der Infektion nachzuweisen. Das Reaktionsmuster war durch einzelne intranukleär gelegene Granula oder eine feingranuläre bis diffuse Färbung des Zellkerns gekennzeichnet, die meist in Neuronen und Astrozyten zu finden war. Allerdings war in der *In-situ*-Hybridisierung insgesamt nur in wenigen Zellen genomische RNA zu finden. In Abb. 26a ist das granuläre nukleäre Reaktionsmuster in einem Neuron im Bulbus olfactorius zu sehen.

BDV-N mRNA

Auch BDV-N mRNA war erst 14 Tage nach der Infektion im ZNS detektierbar. Das Reaktionsmuster war meist durch eine diffuse dunkelblaue Färbung des Zytoplasmas gekennzeichnet, die überwiegend in Neuronen und Astrozyten zu finden war. In Abb. 26b ist ein Ausschnitt des Bulbus olfactorius nahe den des Ethmoidis zu sehen.

Abb. 26: *In-situ*-Hybridisierung zum Nachweis genomischer RNA und BDV-N mRNA im Gehirn



a, b: 14 dpi; Pfeil: genomische virale bzw. BDV-N mRNA; Balken: 50 μ m

4.2.4.4 Negativkontrollen der *In-situ*-Hybridisierung

Als Negativkontrollen wurde Gewebe von Mock-infizierten Versuchstieren verwendet. Mit den Gewebeschnitten dieser Tiere wurde die *In-situ*-Hybridisierung analog zu den Gewebeschnitten der BDV-infizierten Versuchstiere durchgeführt. Eine als positiv zu bewertende dunkelblaue bis schwarzbraune Anfärbung zellulärer Komponenten lag nicht vor. Weiterhin wurde bei jedem Versuchstier, das in der *In-situ*-Hybridisierung untersucht wurde,

neben der Inkubation mit den RNA-spezifischen Sonden auch eine Inkubation mit reinem Hybridisierungs-Mix durchgeführt. Bei keinem der untersuchten Tiere fand sich hier eine als positiv zu bewertende Farbreaktion.

4.2.5 Übergreifende statistische Auswertung der *In-vivo*-Infektionsversuche

Um zu untersuchen, ob der Nachweis von BDV-N (4.2.3.1) bzw. der entsprechenden genomischen RNA und der mRNA (4.2.4.2) abhängig vom Untersuchungszeitpunkt nach der Infektion war, wurde ein exakter Kruskal-Wallis-Test durchgeführt. Es konnte berechnet werden, dass der Einfluss des Untersuchungszeitpunktes auf den immunhistologischen Nachweis von BDV-N bei allen untersuchten Zelltypen bzw. in den Nervenfasern signifikant war. Hier ergaben sich stets Werte von $p < 0,05$ (Tab. 31). Das bedeutet, dass bei globaler Betrachtung der vermehrte Nachweis von BDV-N im Infektionsverlauf in allen Zelltypen des olfaktorischen Epithels signifikant war. Dies spricht für eine Ausbreitung des BDV im olfaktorischen Epithel im Laufe der Infektion.

Diese Beobachtungen trafen ebenfalls für die genomische RNA bei den adulten und juvenilen Neuronen sowie bei den Nervenfasern und bei den olfaktorischen Hüllzellen zu. Hier ergaben sich stets Werte von $p < 0,05$ (Tab. 31). Die Zunahme der Zahl positiver Zellen, die mittels der *In-situ*-Hybridisierung detektiert wurden, war demnach abhängig vom Untersuchungszeitpunkt nach der BDV-Infektion. Folglich war, bei globaler Betrachtung, der vermehrte Nachweis von genomischer RNA in diesen Zelltypen des olfaktorischen Epithels im Laufe der Zeit signifikant, was für eine vermehrte Replikation des BDV im Laufe der Zeit im olfaktorischen Epithel sprechen kann. In den Stützzellen und in beiden Typen der Basalzellen konnte mittels *In-situ*-Hybridisierung keine genomische RNA nachgewiesen werden.

Auch für den Nachweis der BDV-N mRNA wurde mit dem exakten Kruskal-Wallis-Test untersucht, ob die vermehrte Zahl positiver Zellen abhängig vom Untersuchungszeitpunkt war. Dies traf, wie bei der genomischen RNA auch, bei den adulten und juvenilen Neuronen sowie bei den Nervenfasern und bei den olfaktorischen Hüllzellen zu ($p < 0,05$; Tab. 31), was auf eine Ausbreitung des BDV und eine vermehrte Transkription im Laufe der Infektion hinweisen kann. In den Stützzellen und in den proliferierenden sowie horizontalen Basalzellen konnte in der *In-situ*-Hybridisierung keine BDV-N mRNA nachgewiesen werden.

Um zu untersuchen, ob ein monotoner Trend bzw. eine stetige Entwicklung bei der zeitabhängigen Zunahme im Nachweis von BDV-N (4.2.3.1), der entsprechenden mRNA oder der genomischen RNA (4.2.4.2) vorlag, wurde jeweils die Rangkorrelation nach Spearman untersucht.

Hinsichtlich des Nachweises von BDV-N konnte für alle untersuchten Zelltypen und Nervenfasern ein Wert von $p < 0,05$ ermittelt werden. Der Rangkorrelationskoeffizient r_s lag für alle untersuchten Zelltypen bzw. für die Nervenfasern bei Werten zwischen 0,52 und 0,76, wobei insbesondere für die adulten olfaktorischen Neurone mit dem Wert 0,76 eine starke Korrelation gefunden wurde (Tab. 32). Somit ist festzuhalten, dass hier ein deutlicher Zusammenhang und ein monotoner Trend zwischen Zeit und Zahl Virusantigen-positiver Zellen zu erkennen war sowie dass im Verlauf der Zeit stetig mehr Antigen nachgewiesen werden konnte und es nicht zu einer Abnahme kam.

Auch für den Nachweis der genomischen RNA wurde der Rangkorrelationskoeffizient r_s nach Spearman untersucht. Dieser konnte jedoch nur für adulte und juvenile Neurone, sowie für Nervenfasern und olfaktorische Hüllzellen ermittelt werden, da nur dort genomische RNA detektiert werden konnte. Hier lag p stets unter 0,05. Für die Zelltypen und die Nervenfasern, in denen der Nachweis der viralen RNA gelang, konnten Werte zwischen 0,56 und 0,77 ermittelt werden (Tab. 32). Somit konnte auch in dieser Untersuchungsreihe ein deutlicher Zusammenhang zwischen Zeit nach der Infektion und Zahl positiver Zellen, in denen genomische RNA gefunden werden konnte, erkannt sowie ein monotoner Trend und damit eine stetige Zunahme der genomischen RNA, beobachtet werden.

Wie auch bei der viralen genomischen RNA konnte der Rangkorrelationskoeffizient nach Spearman lediglich für die adulten und juvenilen Neurone sowie für die Nervenfasern und die olfaktorischen Hüllzellen ermittelt werden, da in den anderen untersuchten Zelltypen in der *In-situ*-Hybridisierung keine spezifische BDV-N mRNA nachgewiesen werden konnte. In den Zelltypen, in denen diese Untersuchung möglich war, lag p immer unter 0,05, was bedeutet, dass die nachgewiesenen Zunahmen über die Zeit signifikant waren. Für die Zelltypen und die Nervenfasern in denen der Nachweis der BDV-N mRNA gelang, wurden Werte zwischen 0,51 und rund 0,8 ermittelt (Tab. 32). Somit kann auch für die nachgewiesene BDV-N mRNA ein deutlicher Zusammenhang und ein monotoner Trend zwischen Zeit und Stärke des Nachweises der BDV-N mRNA bestätigt werden, was bedeutet, dass eine stetige Zunahme über die Zeit nachzuweisen war.

4.2.6 Nachweis von Proliferationsmarkern im olfaktorischen Epithel

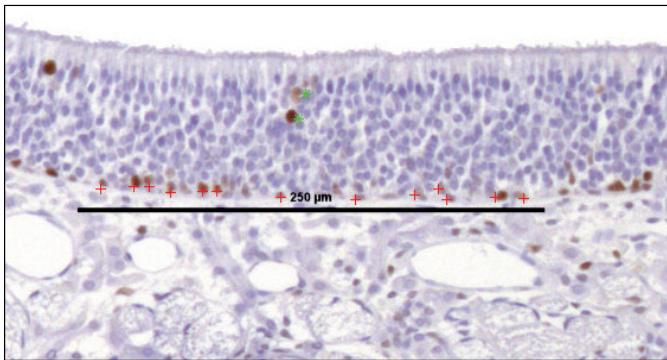
In diesem Teil der Arbeit wurde untersucht, ob die intranasale Infektion mit dem BDV mit einer Änderung der Proliferationsrate der olfaktorischen Neurone einhergeht. Untersucht wurden je 3 BDV-infizierte und 2 Mock-infizierte Ratten zu den Untersuchungszeitpunkten 2, 4 und 7 dpi. Als Proliferationsmarker wurde PCNA (*Proliferating cell nuclear antigen*) verwendet. Im Riechepithel konnten sowohl die Kerne der proliferierenden Basalzellen als auch die sich teilenden Stützzellen dargestellt werden. Die braun markierten Zellkerne

wurden in 20 Abschnitten des olfaktorischen Epithels in jedem Tier gezählt. Ein Abschnitt entsprach hierbei einer Epithellänge von 250 μm (Abb. 27).

4.2.6.1 Reaktionsmuster

Die positive immunhistologische Reaktion zeigte sich als diffuse braune Kernfärbung der proliferierenden Basalzellen. Daneben konnten eine vergleichbare Reaktion auch in den Kernen der Stützzellen vorgefunden werden, die jedoch augenscheinlich zahlenmäßig deutlich schwächer ausgeprägt war (Abb. 27).

Abb. 27: Immunhistologischer Nachweis und Auszählung von PCNA im olfaktorischen Epithel der Ratte



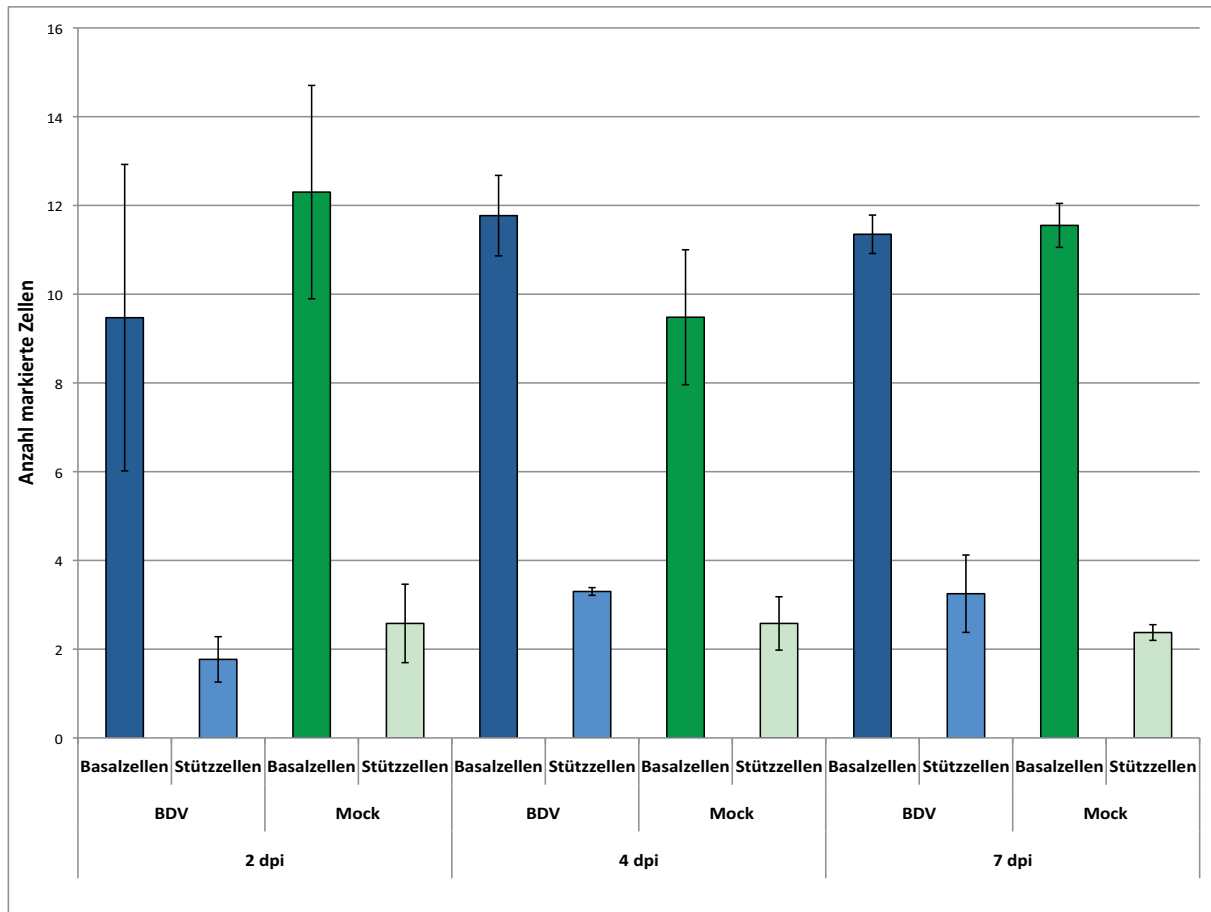
Rotes +: positive proliferierende Basalzelle; grünes *: positive Stützzelle

4.2.6.2 Gegenüberstellung der Proliferationsrate in BDV- und Mock-infizierten Tieren

2 Tage nach der Infektion mit dem BDV konnte in den 20 bewerteten Epithelabschnitten der 3 Tiere durchschnittlich rund 9 proliferierender Basalzellen pro 250 μm -Abschnitt gezählt werden. Die Zahl der markierten Kerne von Stützzellen lag bei rund 2 markierten Zellen in den untersuchten Epithelabschnitten. Zum Untersuchungszeitpunkt 4 dpi betrug der Durchschnitt 12 markierte Basalzellen pro definierter Epithellänge. Bei der Auszählung der Stützzellen ergab sich ein Durchschnitt von rund 3 positiven Zellen. Am 7. Tag nach der Infektion lag der Durchschnitt bei 11 markierten proliferierenden Basalzellen pro 250 μm des olfaktorischen Epithels. Durchschnittlich 3 Stützzellen waren zu diesem Zeitpunkt in den untersuchten Epithelabschnitten positiv. In den Tieren, bei denen eine Mock-Infektion durchgeführt wurde, waren 2 Tage nach der Mock-Infektion durchschnittlich rund 12 proliferierende Basalzellen in den ausgemessenen Epithelabschnitten darstellbar. Zu diesem Zeitpunkt waren in den 20 untersuchten Abschnitten durchschnittlich rund 3 positive Zellkerne von Stützzellen zu finden. In den Ratten, die 4 Tage nach der Mock-Infektion untersucht wurden, konnten immunhistologisch ca. 9 Basalzellen markiert werden. Zur

gleichen Zeit fand sich bei den Stützzellen ebenfalls ein Mittelwert von rund 3 positiven Zellen pro Epithelabschnitt. 7 Tage nach der Mock-Infektion lag der Durchschnitt der proliferierenden Basalzellen bei 12 Zellen. Immunhistologisch konnten durchschnittlich rund 2 Stützzellen in den 250 µm-Abschnitten des olfaktorischen Epithels detektiert werden. Beim Vergleich der BDV- mit den Mock-infizierten Ratten zu den unterschiedlichen Untersuchungszeitpunkten fiel auf, dass 2 Tage nach der intranasalen Infektion geringfügig mehr markierte Basal- und Stützzellen in den Mock-infizierten Tieren als in den BDV-infizierten Tieren zu finden waren. Betrachtete man hingegen die Untersuchungszeitpunkte 4 und 7 Tage nach der Infektion, war eine Umkehr des Trends zu erkennen. Zu beiden Zeitpunkten fanden sich etwas mehr positive proliferierende Basalzellen und Stützzellen in den BDV-infizierten Tieren als in den Mock-infizierten Tieren. Eine Ausnahme stellten hier allerdings die proliferierenden Basalzellen dar, deren Wert 7 Tage nach der Inokulation auch in den Mock-infizierten Tieren größer war als in den BDV-infizierten Tieren. Insgesamt konnte festgestellt werden, dass die proliferierenden Basalzellen in beiden Tiergruppen eine deutlich stärkere Proliferation zeigten als die Stützzellen. Im zeitlichen Verlauf änderte sich die Proliferationsrate der beiden Zelltypen in den Gruppen BDV-Infektion und Mock-Infektion allerdings nur geringfügig. Die Ergebnisse der Zellzählung sind graphisch in Abb. 28 dargestellt.

Abb. 28: Anzahl der PCNA-positiven Basal- und Stützzellen im Bezug auf die BDV- und Mock-infizierten Tiere zu den unterschiedlichen Untersuchungszeitpunkten



x-Achse: Basal- und Stützzellen der Gruppen BDV-infiziert und Mock-infiziert zu den Zeitpunkten 2, 4, 7 Tage nach der Infektion; PCNA: *Proliferating cell nuclear antigen*; dpi: *days post infection*; arithmetrischer Mittelwert; Fehlerbalken: Standardabweichung

Eine zweifaktorielle Varianzanalyse zum Nachweis potentieller Effekte von Infektion und Zeit auf die Zahl positiver Zellen sowie Wechselwirkungen zwischen beiden Faktoren ergab keine signifikanten Ergebnisse. Die p-Werte lagen für den Faktor Infektion bei 0,8153, für den Faktor Zeit bei 0,8016 und für die Wechselwirkung zwischen beiden Faktoren bei 0,1818 und waren somit nicht signifikant.

4.3 DISSOZIATIONSKULTUR DES OLFAKTORISCHEN EPITHELIS

4.3.1 Charakterisierung der Dissoziationskultur

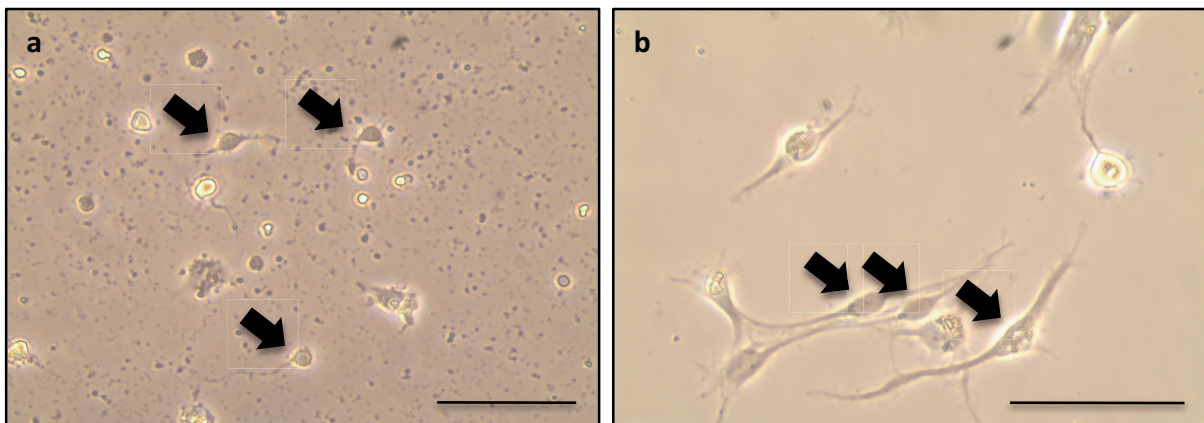
4.3.1.1 Zellmorphologie in der nativen Kultur

Einen Tag nach der Aussaat der Zellen (*days in vitro*, DIV) wurde die native Kultur lichtmikroskopisch begutachtet. Es fand sich ein heterogenes Bild von in Gruppen oder

einzelnen liegenden Zellen. Neben nicht-neuronalen Zellen fanden sich auch die olfaktorischen Neurone, die zu diesem Zeitpunkt bereits die Zellfortsätze ausgestreckt hatte. Der Zellleib, der zum Großteil mit dem runden Zellkern ausgefüllt war, stellte sich im Lichtmikroskop als hell leuchtend dar. Oft konnte der Dendrit, bei dem häufig der Endknopf erkennbar war, identifiziert werden. Das Axon war nicht immer zu erkennen. Daneben fielen die olfaktorischen Hüllzellen als weitere dominierende Komponente in der Mischkultur auf. Sie zeigten sich als lange, schmale Spindelzellen mit ovalem Zellkern, der entsprechend der Längsachse der Zelle orientiert war. Im Kern waren meist 1 bis 2 deutlich abgegrenzte Nukleoli sichtbar. Im Gegensatz zu den Zellen, die in ihrer Morphologie Fibroblasten entsprachen, war dieser Zelltyp einen Tag nach der Aussaat viel schmaler und besaß längere Fortsätze.

In der Abb. 29a sind Zellen, die der Morphologie olfaktorischer Neurone entsprachen und in Abb. 29b sind Zellen, die der Morphologie olfaktorischer Hüllzellen entsprachen, abgebildet.

Abb. 29: Native Dissoziationskultur des olfaktorischen Epithels



a, b: 2 DIV; Pfeile in a: olfaktorische Neurone; Pfeile in b: olfaktorische Hüllzellen; Balken a: 50 μm , b: 100 μm

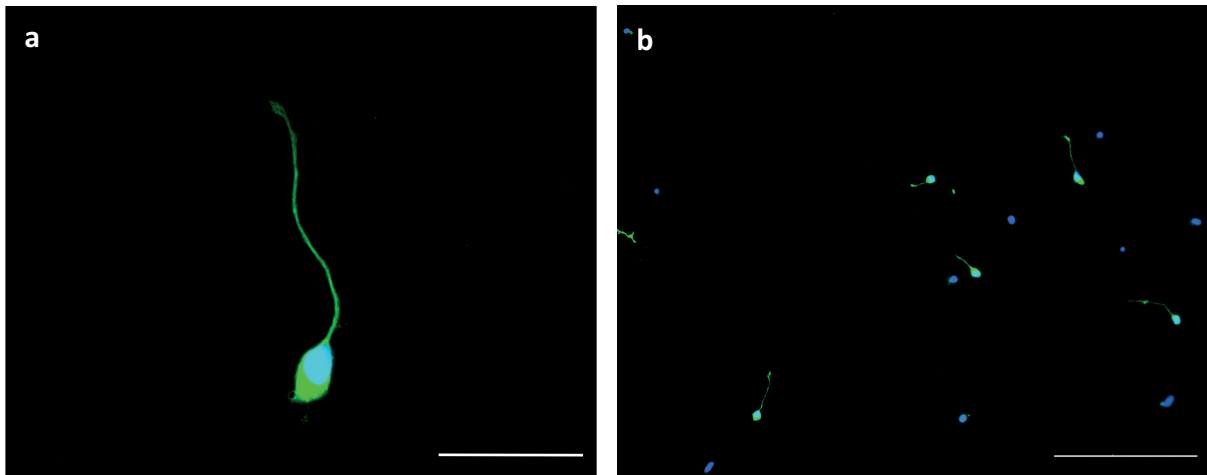
Auch nach 14 DIV war der überwiegende Teil der Zellen noch vital und zeigte keine Hinweise auf Zelltod wie Abrunden oder Ablösen. Anders sah es hingegen bei den Neuronen aus, welche ab 4 DIV deutlich in ihrer Zahl verringert waren.

4.3.1.2 Reaktionsmuster der olfaktorischen Neurone

In der Immunfluoreszenz (IF) stellten sich die olfaktorischen Neurone als einzeln oder in Gruppen liegende bipolare und β III-Tubulin-positive Zellen mit Dendrit und zum Teil mit Axon dar. Sowohl der Dendrit und, falls vorhanden, das Axon sowie ein schmaler Zytoplasmasaum um den Zellkern herum waren homogen grün angefärbt. Oft konnte der Endknopf des Dendriten identifiziert werden (Abb. 30). Auffallend war außerdem, dass der

Dendrit bzw. gegebenenfalls das Axon der Nervenzellen erst ab ca. 1 Tag in der Kultur sichtbar wurden. Zu den früheren Zeitpunkten schienen diese Zellfortsätze noch in der Nähe des Zellkörpers zu liegen und noch nicht ausgestreckt zu sein.

Abb. 30: Immunfluoreszenz der Dissoziationskultur des olfaktorischen Epithels zur Darstellung der olfaktorischen Neurone

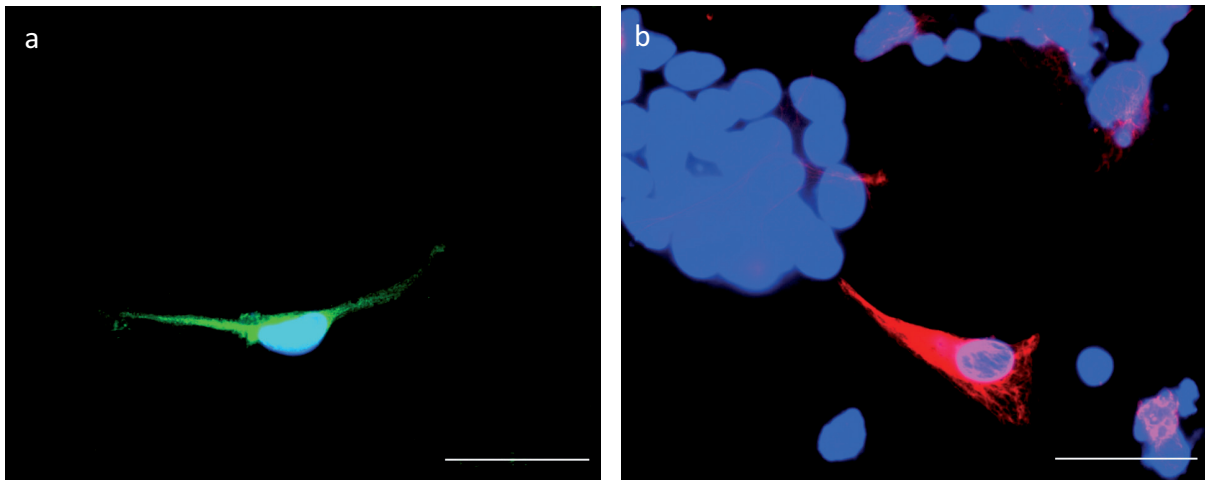


a, b: olfaktorische Neurone 2 DIV; β III-Tubulin, Cy2; Kernfärbung: DAPI; Balken a: 20 μ m, b: 100 μ m

4.3.1.3 Reaktionsmuster nicht-neuronaler Zellen

Die morphologisch als olfaktorische Hüllzellen identifizierbaren Zellen wurden anhand ihrer GFAP-Expression detektiert. Diese Zellen zeigten eine Anfärbung des Zytoplasmas mit fädiger bis feinfädiger Struktur. Um zu beurteilen, in welchem Ausmaß die Mischkultur auch unerwünschte Fibroblasten aus der Lamina propria enthielt, wurden Vimentin-positive Zellen dargestellt, die eine ausgeprägte Anfärbung des Zytoplasmas aufwiesen. In der Abb. 31a sind eine GFAP-positive olfaktorische Hüllzelle und in der Abb. 31b ein Vimentin-positiver Fibroblast abgebildet.

Abb. 31: Immunfluoreszenz der Dissoziationskultur des olfaktorischen Epithels zur Darstellung der olfaktorischen Hüllzellen und der Fibroblasten

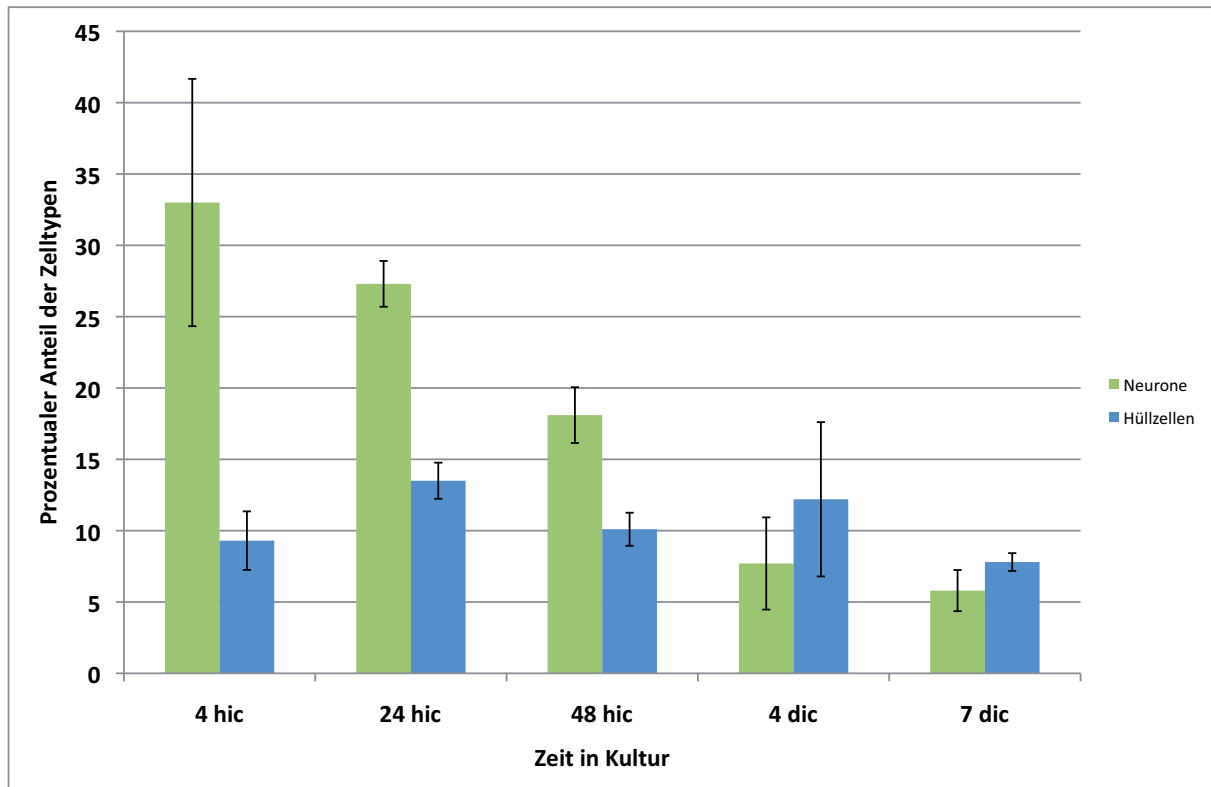


a: olfaktorische Hüllzelle; GFAP, Cy2; b: Fibroblast; Vimentin, Cy3; Kernfärbung DAPI; Balken: 20 μ m

4.3.1.4 Quantifizierung ausgewählter zellulärer Komponenten

Um den Anteil der adulten Neurone an der Gesamtzellpopulation zu bestimmen, wurden die β III-Tubulin-positiven Neurone ausgezählt. Als Neurone wurden die Zellen gezählt, deren Zytoplasma, Axon und Dendrit eine deutliche, leuchtend grüne Färbung aufwiesen. Gleichzeitig war es aufgrund einer schemenhaften Hintergrundfärbung möglich, Zellen zu identifizieren, die der Morphologie der olfaktorischen Hüllzellen entsprachen. Pro Untersuchungszeitpunkt und Wiederholung wurden mindestens 600 Zellen, verteilt auf 3 Deckgläschen, gezählt. Demnach wurden pro Zeitpunkt mindestens 1800 Zellen bzw. DAPI-positive Kerne ausgewertet. Vier Stunden nach der Aussaat konnten zwischen rund 26 % und 45 % mit β III-Tubulin markierte Neurone gezählt werden. Der Durchschnitt lag bei 33 %. Nach 24 Stunden in Kultur waren durchschnittlich rund 27 % der Zellen als Neurone identifizierbar. Der prozentuale Anteil lag zwischen rund 26 % und 29 %. Der durchschnittliche Anteil der Neurone verringerte sich im weiteren Zeitverlauf auf durchschnittlich 18 % nach 48 Stunden bzw. auf rund 8 % nach 4 DIV, wobei nach 48 h in Kultur der prozentuale Anteil zwischen 16 % und 20 % bzw. nach 4 DIV zwischen 5 % und 12 % lag. Zum Ende der Versuchsreihe, 7 Tage nach der Aussaat, konnten lediglich zwischen 5 % und 8 % der Zellen als Neurone angesprochen werden. Der Durchschnitt lag in diesem Fall bei rund 6 %. Bei den olfaktorischen Hüllzellen zeigte sich über die Kulturdauer keine eindeutige Zu- oder Abnahme. Im Laufe der Zeit waren Schwankungen des durchschnittlichen Anteils an der Gesamtzellpopulation zwischen rund 8 % und 14 % zu finden. Der zeitliche Verlauf beider zellulärer Komponenten ist in Abb. 32 dargestellt.

Abb. 32: Prozentualer Anteil der untersuchten Zelltypen an der Gesamtzellzahl der Dissoziationskultur des olfaktorischen Epithels bezogen auf die Zeit in Kultur



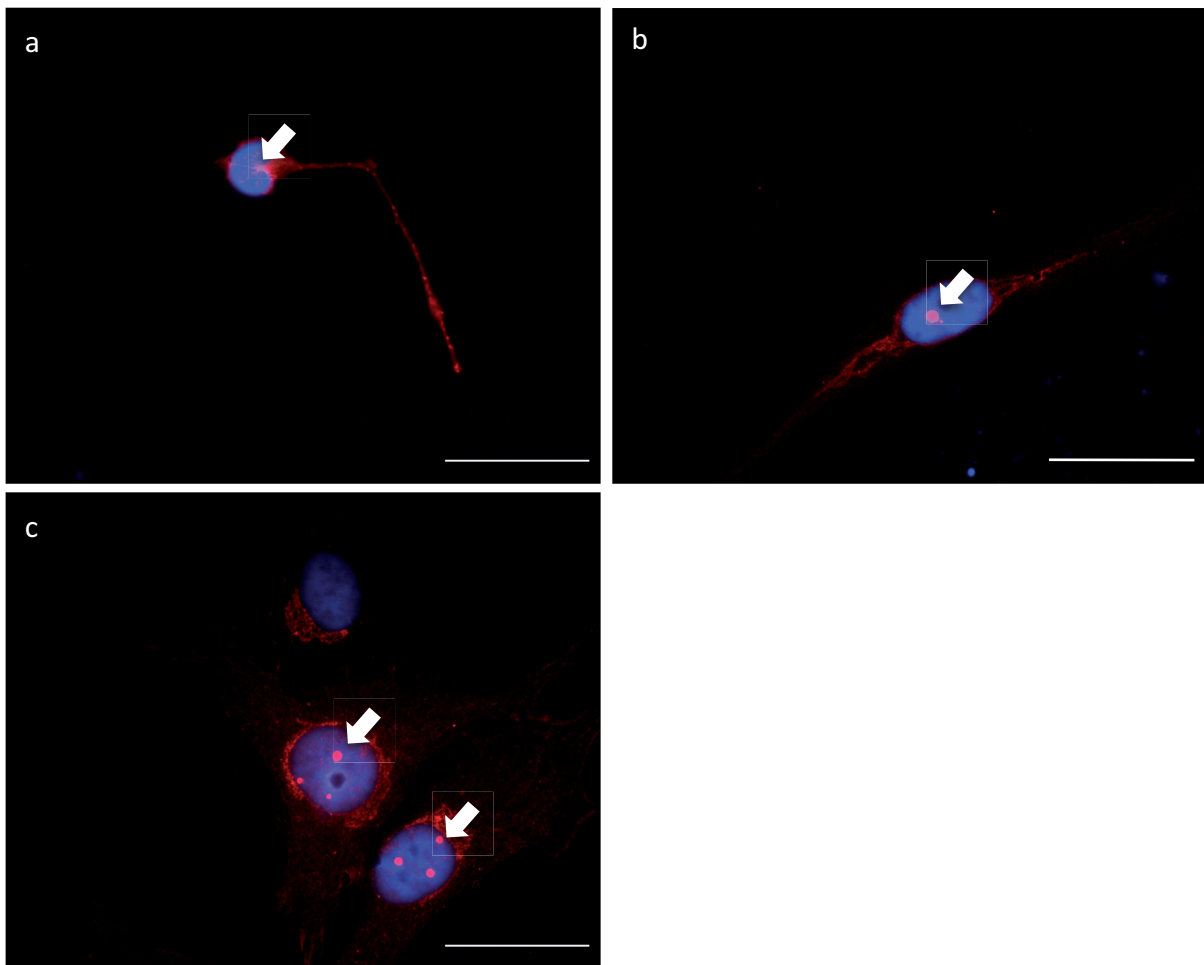
x-Achse: Zeit in Kultur; y-Achse: prozentualer Anteil der Zelltypen an der Gesamtzellzahl der Dissoziationskultur; h: Stunden; d: Tage; arithmetrischer Mittelwert; Fehlerbalken: Standardabweichung

4.3.2 BDV-Infektion der Dissoziationskultur

4.3.2.1 Indirekte Immunfluoreszenz zum Nachweis von BDV-N

Die Dissoziationskultur wurde zum Zeitpunkt 1 DIV mit BDV-infiziert und zu den Zeitpunkten 4, 7, 10 sowie 14 dpi auf das Vorhandensein von BDV-N untersucht. Als positiv wurde eine Zelle bewertet, die eine intranukleäre, granuläre und bei der Verwendung des Cy3-gekoppelten Sekundärantikörpers leuchtend rote Färbung aufwies, die in der Negativkontrolle nicht zu finden war. Meist waren mehrere Granula unterschiedlicher Größe in einem Zellkern zu finden. Es konnte zudem beobachtet werden, dass ein Großteil der Zellen mit dieser Kernreaktion auch eine starke diffuse Rotfärbung des Zytoplasmas aufwiesen, die deutlich über das Maß der Hintergrundfärbung negativer Zellen hinaus ging. In Abb. 33 sind verschiedenen Zelltypen abgebildet, die die typische intranukleäre granuläre Färbung des Zellkerns nach der BDV-Infektion aufwiesen.

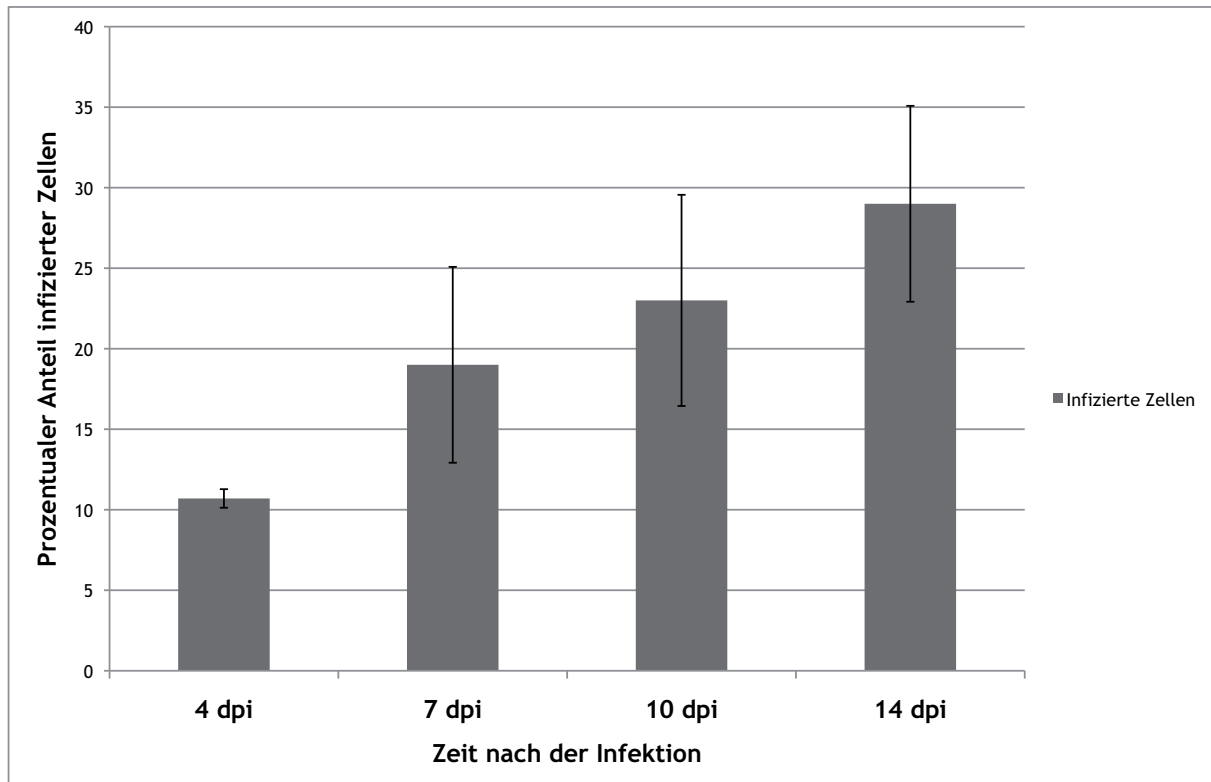
Abb. 33: Immunfluoreszenz der Dissoziationskultur des olfaktorischen Epithels zum Nachweis von BDV-N



a: olfaktorisches Neuron; b: olfaktorische Hüllzelle; c: nicht-neuronale Zellen; Bo18, Cy3; Kernfärbung: DAPI; a, c: 7 Tage nach der Infektion; b: 4 Tage nach der Infektion; Pfeile: intranukleärer Nachweis von BDV-N; Balken: 20 μ m

Pro Zeitpunkt einer jeden Wiederholung wurden mindestens 400 Zellen gezählt und die Anzahl BDV-N-positiver Zellen an der Gesamtzellzahl bestimmt. Insgesamt wurden so pro Zeitpunkt mindestens 1200 Zellen ausgewertet. Vier Tage nach der Infektion zeigten zwischen 10 % und 11 % der Zellen die beschriebene Kernreaktion bzw. in vielen Fällen zusätzlich auch die diffuse Zytoplasmareaktion. Nach 7 Tagen lag der prozentuale Anteil der infizierten Zellen zwischen 12 % und 23 %, mit einem Durchschnitt von 19 %. 10 Tage nach der Infektion konnte ein weiterer Anstieg des prozentualen Anteils ausgemacht werden, der zwischen 16 % und 24 % lag. Der Mittelwert für diesen Zeitpunkt betrug 23 %. Am Ende der Versuchsreihe, 14 Tage nach der Infektion, waren durchschnittlich 29 % der Zellen sicher infiziert. Die prozentualen Anteile lagen zwischen 25 % und 36 %. Insgesamt konnte ein Anstieg der infizierten Zellen im Infektionszeitraum verzeichnet werden. Dieser Verlauf ist in Abb. 34 dargestellt.

Abb. 34: Prozentualer Anteil der infizierten Zellen nach BDV-Infektion an der Gesamtzellzahl der Dissoziationskultur des olfaktorischen Epithels bezogen auf die Zeit in Kultur

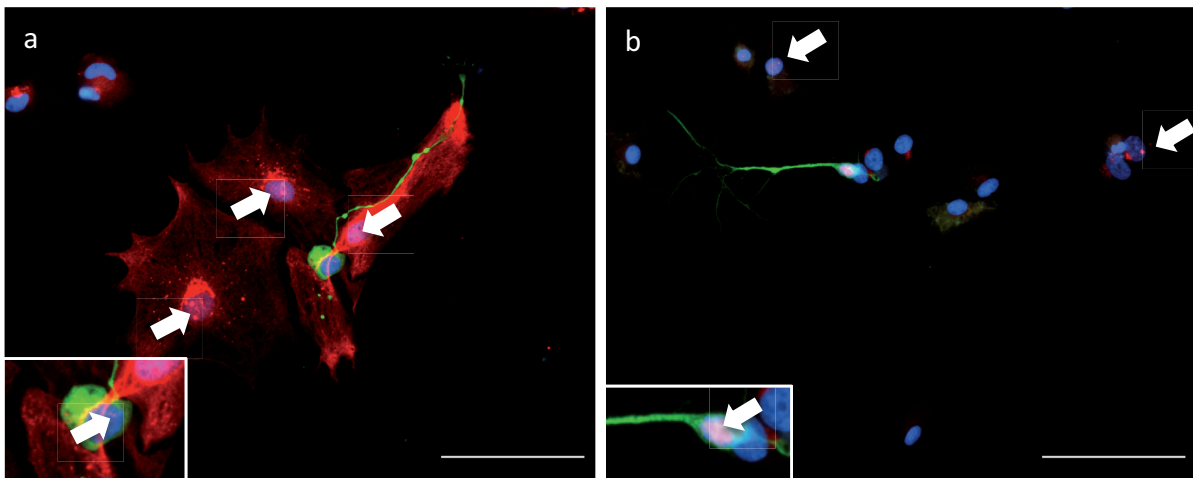


x-Achse: Zeit nach der Infektion; y-Achse: prozentualer Anteil der infizierten Zellen an der Gesamtzellzahl; dpi: *days post infection*; arithmetrischer Mittelwert; Fehlerbalken: Standardabweichung

4.3.2.2 Nachweis BDV-infizierter olfaktorischer Neurone

Als Bestätigung, dass die olfaktorischen Neurone mit BDV infizierbar sind, wurde in ausgewählten Kulturen eine Doppelmarkierung durchgeführt. Hierzu wurden β III-Tubulin als Marker für olfaktorische Neurone und Bo18 zum Nachweis von BDV-N verwendet. β III-Tubulin war als typische Anfärbung des Zytoplasmas und der Zellfortsätze zu finden und BDV-N als typische granuläre Kernreaktion. Allerdings waren nicht viele BDV-N positive Neurone darstellbar, da eine ausgeprägte Infektion der Kultur mit dem BDV meist erst nach 4 Tagen sichtbar war. Zu diesem Zeitpunkt waren durchschnittlich allerdings nur noch rund 8 % Riechnervenzellen in der Kultur vorhanden. Zwei ausgewählte Beispiele einer Doppelmarkierung zum Untersuchungszeitpunkt 4 dpi sind in Abb. 35 zu sehen. Auffällig hierbei war die sehr feingranuläre Reaktion in einem der Neurone (Abb. 35a) im Vergleich zu der eher groben und ausgeprägteren Reaktion des anderen Neurons (Abb. 35b).

Abb. 35: Immunfluoreszenz der Dissoziationskultur des olfaktorischen Epithels nach BDV-Infektion zum Nachweis von BDV-N und zur Darstellung olfaktorischer Neurone



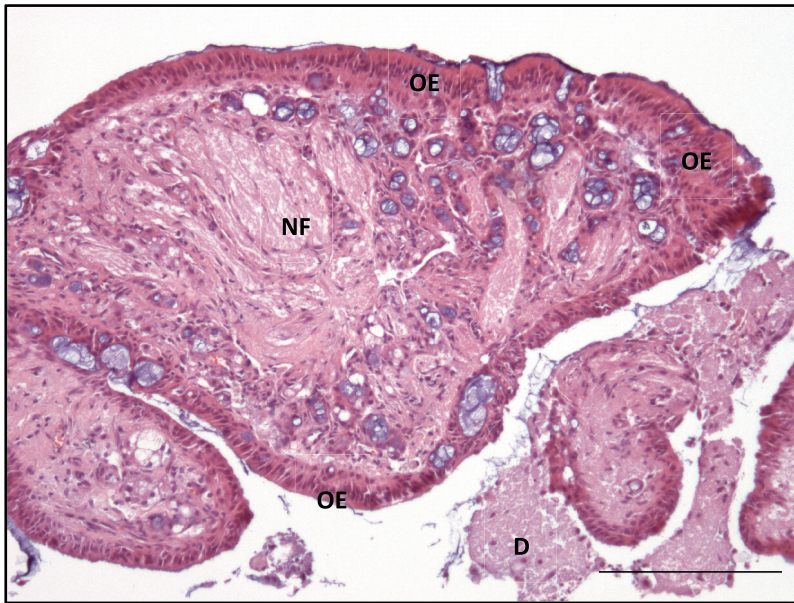
a, b: nicht-neuronale Zellen und in grün: olfaktorisches Neuron, β III-Tubulin, Cy2; rot: Bo18 (BDV-N), Cy3; Kernfärbung: DAPI; 4 dpi; Inserts: Vergrößerung der Zellkerne der olfaktorischen Neurone; Pfeile: intranukleärer Nachweis von BDV-N; Balken: 50 μ m

4.4 ORGANOTYPISCHE GEWEBEKULTUR DES OLFAKTORISCHEN EPITHEL

4.4.1 Charakterisierung der organotypischen Gewebekultur

In zahlreichen Vorversuchen wurden die optimalen Kulturbedingungen für die organotypische Gewebekultur des olfaktorischen Epithels bestimmt. Der Erhalt von Morphologie und Struktur war am besten, wenn die Knorpel- und Knochenbestandteile an den Gewebestücken belassen wurden (Abb. 36). Dies hatte zwar zur Folge, dass sich nicht alle Stücke an der Membran anhefteten, jedoch konnte so einer Dissoziation der Kulturen über die Zeit entgegen gewirkt werden. Da präparationsbedingt nicht nur olfaktorisches, sondern auch geringe Anteile respiratorisches Epithel mit in Kultur gebracht wurden, konnte im Mikroskop die Vitalität des Epithels begutachtet werden. Auch 14 Tage nach der Präparation war in einigen Bereichen noch eine Flimmerbewegung des respiratorischen Epithels sichtbar. Die Gewebestücke bestanden, je nach Entnahmestelle, aus Knorpel- oder Knochenanteilen des Nasenseptums oder der Nasenmuscheln, der Lamina propria mit den Nervenfasern sowie olfaktorischem bzw. in Teilen respiratorischem Epithel. Oft flachte das Epithel über die Zeit ab oder dünnte aus, weshalb nicht immer die vollständige epitheliale Oberfläche zu allen Untersuchungszeitpunkten zur Begutachtung vorlag. Die abgeschilferten epithelialen Zellen sammelten sich neben den Gewebestücken auf der Membran.

Abb. 36: H&E-Färbung der organotypischen Gewebekultur



2 DIV; OE: olfaktorisches Epithel; NF: Nervenfasern; D: Detritus; Balken: 200 µm

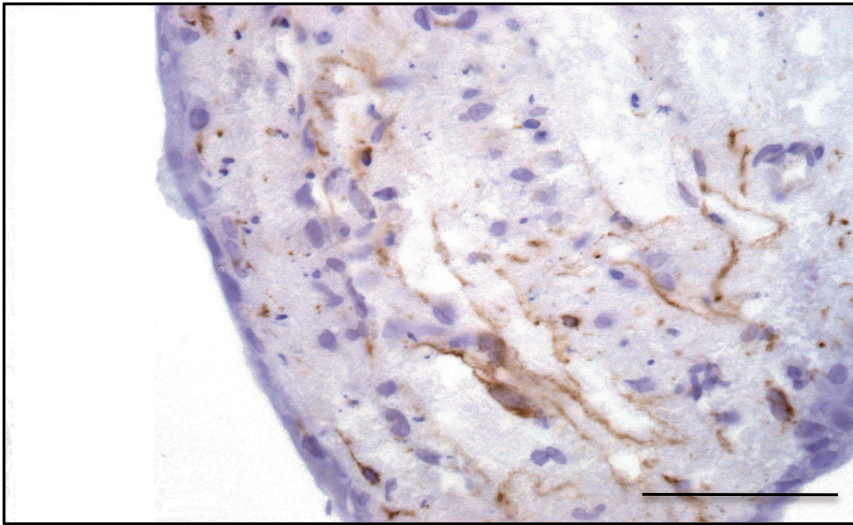
4.4.2 BDV-Infektion der organotypischen Gewebekultur

Nach der Präparation wurden die Gewebestücke mit der BDV-Virussuspension infiziert und 4, 7, 10 und 14 dpi mit 4 % PFA fixiert und eingebettet (3.4.2)

4.4.2.1 Immunhistologischer Nachweis von BDV-N

BDV-N war erstmals 4 Tage nach der Infektion nachweisbar (Abb. 37). Auffallend war, dass dies zuerst meist in Zellen mit der Morphologie und Lokalisation von olfaktorischen Hüllzellen der Fall war. Diese lagen in unmittelbarer Nähe der Nervenfaserbündel in der Lamina propria der Gewebestückchen. Hinweise auf eine Infektion des olfaktorischen Epithels der Gewebestückchen ergaben sich zu keinem der Zeitpunkte. Während der histologischen Aufarbeitung der Gewebestückchen wurde deutlich, dass die Auswertung durch die geringe Größe der Proben sehr erschwert wurde, da die Stücke oft verkippten und das Epithel auf dem histologischen Schnitt nur noch unvollständig zur Begutachtung vorlag.

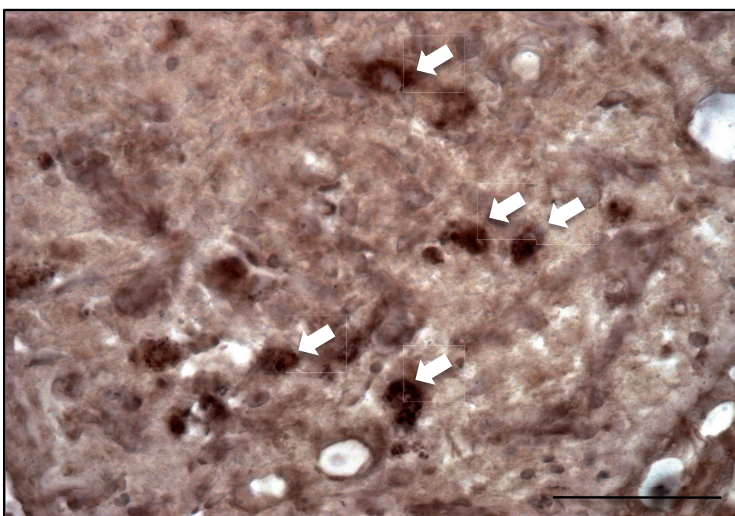
Insgesamt erwies sich diese Methode als bedingt geeignet zur Untersuchung der BDV-Infektion. Innerhalb eines Präparationsansatzes fanden sich viele Gewebestückchen, die als negativ bewertet werden mussten. Pro Ansatz waren nur wenige Zellen in einzelnen Stückchen positiv. Auch eine Zunahme des Antigen-Nachweises über die Zeit konnte nicht beobachtet werden.

Abb. 37: Immunhistologie zum Nachweis von BDV-N

4 dpi; Balken: 50 μ m

4.4.2.2 Nachweis von viraler genomischer RNA und BDV-N mRNA mittels *In-situ*-Hybridisierung

Der Nachweis von BDV-N mRNA war mittels *In-situ*-Hybridisierung erstmals 4 Tage nach der Infektion möglich. Diese zeigte sich als eine granulären bis fleckige Farbreaktion im Zytoplasma einiger Zellen. Diese lagen, wie BDV-N, ebenfalls in der Lamina propria (Abb. 38). Während zu frühen Untersuchungszeitpunkten (4 dpi) viele Zellen eine deutliche Farbreaktion aufwiesen, war zu späteren Untersuchungszeitpunkten die Farbreaktion nur noch vereinzelt in den Gewebestückchen und nicht regelmäßig in allen Ansätzen vorhanden. Wie auch beim Nachweis von BDV-N, konnte keine mRNA im olfaktorischen Epithel der Gewebekultur gefunden werden. Genomische RNA war zu keinem Zeitpunkt detektierbar.

Abb. 38: *In-situ*-Hybridisierung zum Nachweis der BDV-N mRNA

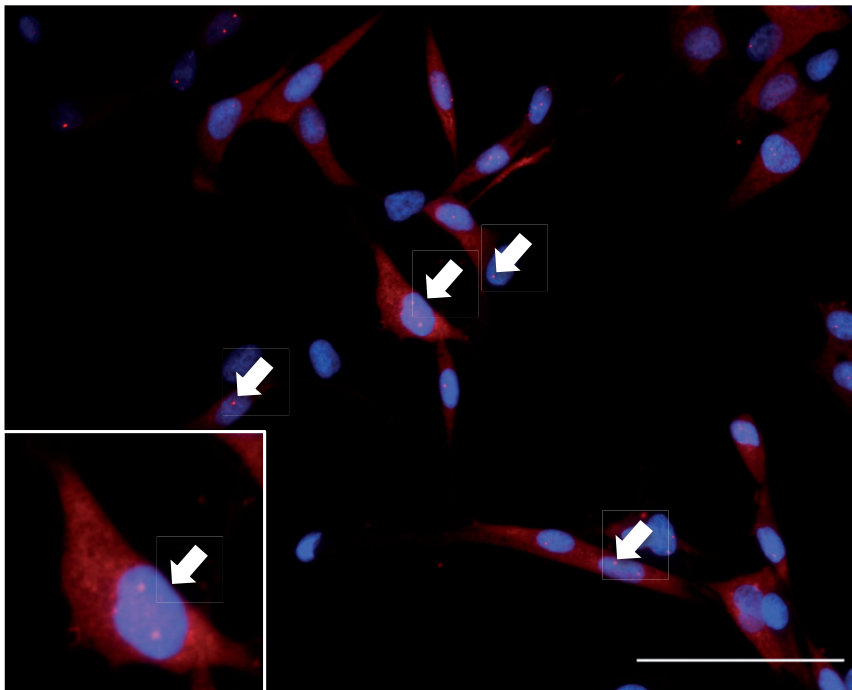
4 dpi; Pfeile: BDV-N mRNA; Balken: 50 μ m

4.5 CO-KULTUR AUS OLFAKTORISCHEM EPITHEL UND OLFAKTORISCHEN HÜLLZELLEN

4.5.1 BDV-Infektion der olfaktorischen Hüllzellen

6 Tage nach der Infektion konnten einzelne oder mehrere rundliche Granula in den Zellkernen BDV-infizierter olfaktorischer Hüllzellen (*olfactory ensheathing cells*, OECs) gefunden werden, die als leuchtend rote Färbung imponierten. Gleichzeitig wiesen die Zellen mit der granulären Kernreaktion auch eine diffuse rote Anfärbung ihres Zytoplasmas auf (Abb. 39). Dieses Reaktionsmuster entsprach dem der Zellen des olfaktorischen Epithels (4.3.2) und auch anderer Zellkulturen (HERZOG und ROTT, 1980).

Abb. 39: Immunfluoreszenz zum Nachweis von BDV-N in OECs



Bo18, Cy3; Kernfärbung: DAPI; Pfeile: BDV-N; Insert: Vergrößerung eines Zellkerns; 6 dpi; Balken: 50 µm

Untersucht wurden 2 verschiedene Passagen der Kultur der OECs, Passage 5 und 6 nach dem Auftauen. In der Passage 5 waren 6 Tage nach der Infektion rund 49 % der Zellen infiziert, in der Passage 6 waren es 76 %. Dies entspricht einem Durchschnitt von rund 63 % aus beiden Ansätzen, was auf eine schnellere Ausbreitung als in der Kultur des olfaktorischen Epithels der Ratte hinweist (4.3.2.1).

4.5.2 BDV-Infektion der Co-Kultur der olfaktorischen Hüllzellen und der Dissoziationskultur des olfaktorischen Epithels

Vor der Infektion wurde mikroskopisch überprüft, dass die Zellen in ihrer Morphologie unverändert waren, um die Vitalität zu bestätigen. 4 und 7 Tage nach der Infektion wurden jeweils die Reinkultur der Dissoziationskultur des olfaktorischen Epithels und die Reinkultur der olfaktorischen Hüllzellen sowie die Mischungen aus olfaktorischem Epithel und olfaktorischen Hüllzellen in den Verhältnissen 3:1 und 1:1 auf das Vorhandensein viraler genomischer RNA und BDV-N mRNA untersucht. Die Quantifizierung erfolgte mittels *real time* RT-PCR.

4.5.2.1 Zusammenfassung der Reaktionsbedingungen der quantitativen *real time* RT-PCR (qPCR)

Sensitivität

In den Läufen der qPCR konnten stets die eingesetzten Verdünnungsstufen 10^3 bis 10^8 der Verdünnungsreihen für die BDV-N-spezifische cDNA nachgewiesen werden. Gleiches galt für die Standardverdünnungsreihe der GAPDH cDNA, bei der in jedem Lauf die Verdünnungsstufen 10^2 bis 10^8 mitgeführt wurden. Der arithmetische Mittelwert der Reaktionseffizienz der qPCR für BDV-N lag bei 0,81 Für GAPDH konnte ein durchschnittlicher Wert von 0,84 ermittelt werden.

Spezifität

In jedem Lauf wurden Kontrollen als *no template control* mitgeführt, bei denen statt der spezifischen cDNA für BDV-N und GAPDH nur steriles Aqua bidest. zugegeben wurde. In keiner der Proben konnte ein Signal detektiert werden.

Nicht infizierte Kontrollen

Für jeden Untersuchungszeitpunkt und jeden Ansatz wurde cDNA aus nichtinfizierten Zellen mitgeführt. Diese Proben wurden entsprechend der anderen infizierten Proben gehandhabt und ebenfalls im Doppelansatz untersucht. In keiner der Proben war virale genomische RNA oder BDV-N mRNA nachweisbar. Die zelleigene mRNA des *housekeeping genes* GAPDH war jedoch in allen Proben nachweisbar. Die Kopienzahl war vergleichbar mit der der infizierten Proben des jeweiligen Ansatzes.

Allgemeine Amplifizierbarkeit der Proben

Für den Nachweis des *housekeeping genes* GAPDH wurden rattenspezifische Primer verwendet, sodass für die caninen Sequenzen mit einer schlechteren Amplifizierbarkeit

gerechnet werden musste. So ergaben sich Unterschiede in den ermittelten Kopienzahlen für GAPDH. Trotzdem ließen sich in jedem Doppelansatz der Proben des reinen olfaktorischen Epithels, der OECs und der Mischkulturen stets GAPDH-spezifische Kopien nachweisen. Dies wurde bei der Auswertung berücksichtigt indem die Kopienzahlen nur innerhalb der Ansätze aus den Reinkulturen bzw. den Co-Kulturen der beiden Mischungsverhältnisse verglichen wurden.

In allen infizierten Proben der beiden Untersuchungszeitpunkte, 4 und 7 dpi, konnten in der qPCR sowohl stets virale genomische RNA als auch BDV-N mRNA nachgewiesen werden. In den nicht-infizierten Proben waren nie BDV-N-spezifische Transkripte nachweisbar.

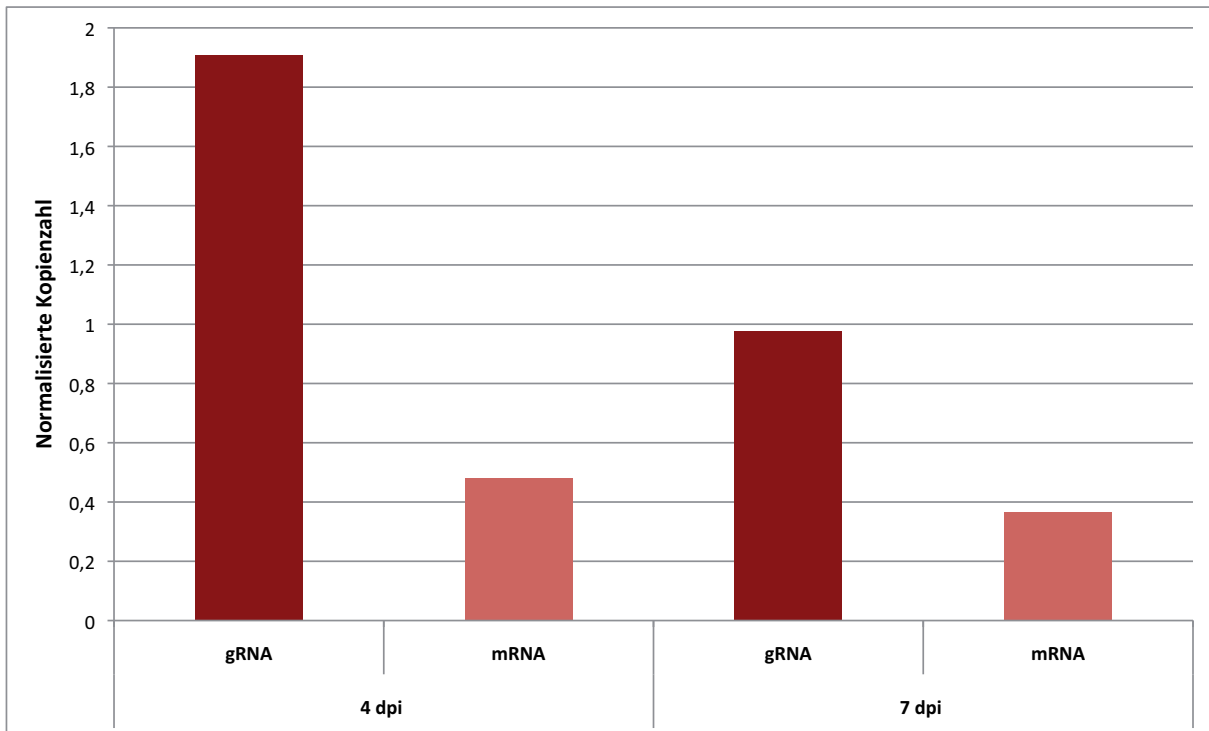
4.5.2.3 Nachweis viraler genomischer und BDV-N mRNA mittels quantitativer real time RT-PCR

Die anhand der Standardverdünnungsreihen bestimmten Kopienzahlen für die genomische RNA (gRNA) und die mRNA des BDV-N-Gens wurden durch die auf die gleiche Weise ermittelten Kopienzahlen für GAPDH derselben Proben geteilt, um normalisierte Kopienzahlen innerhalb eines Ansatzes zu erhalten.

Aufgrund der Unterschiede in den Kopienzahlen des *housekeeping genes* GAPDH zwischen den 4 Gruppen konnten die absoluten Zahlen nur gruppenintern über den Zeitverlauf bewertet werden. Ein Vergleich zwischen den Gruppen war durch die Bildung eines Quotienten des Verhältnisses der Kopienzahl der viralen genomischen RNA zu der Kopienzahl der mRNA möglich.

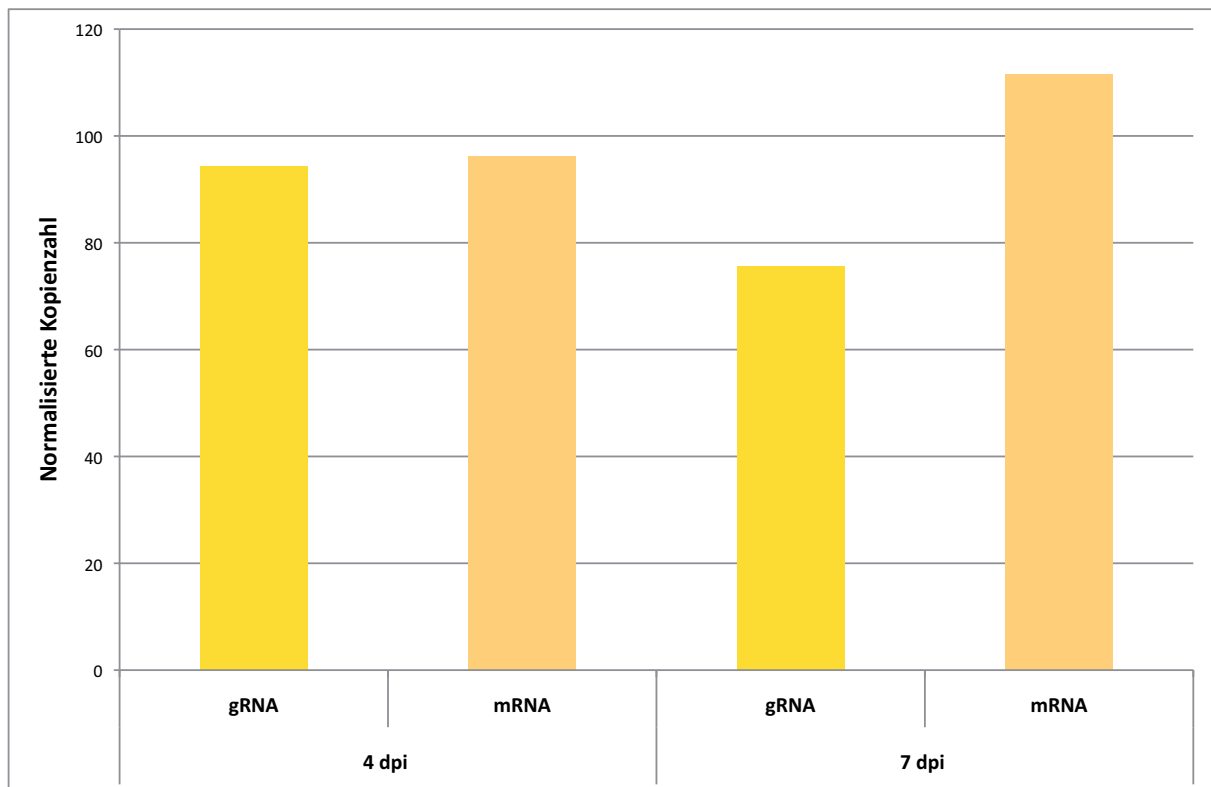
Bei der Auswertung der reinen Kultur des olfaktorischen Epithels waren 4 Tage nach der Infektion durchschnittlich 1,91 Kopien BDV-N-spezifische genomische RNA (gRNA) pro Kopie GAPDH nachweisbar. Zu diesem Zeitpunkt lagen durchschnittlich 0,48 Kopien der entsprechenden mRNA pro Kopie GAPDH vor. Dies entsprach einem Verhältnis von 1:0,25 Kopien gRNA/Kopien mRNA und damit deutlich mehr genomischer RNA. 7 Tage nach der Infektion ließen sich in diesem Ansatz nur noch 0,98 Kopien der genomischen RNA pro Kopie GAPDH nachweisen. Die Zahl der Kopien der mRNA reduzierte sich auf rund 0,37 pro Kopie GAPDH. Das Verhältnis von gRNA zur mRNA lag bei 1:0,38. Diese Ergebnisse sind graphisch in Abb. 40 dargestellt.

Abb. 40: Nachweis BDV-N-spezifischer genomischer RNA und mRNA in der Kultur des olfaktorischen Epithels



x-Achse: genomische RNA (gRNA) und messenger RNA (mRNA) zu den Untersuchungszeitpunkten 4 und 7 Tage nach der Infektion; y-Achse: normalisierte Kopienzahl; dpi: *days post infection*; OE: olfaktorisches Epithel; OEC: olfaktorische Hüllzellen

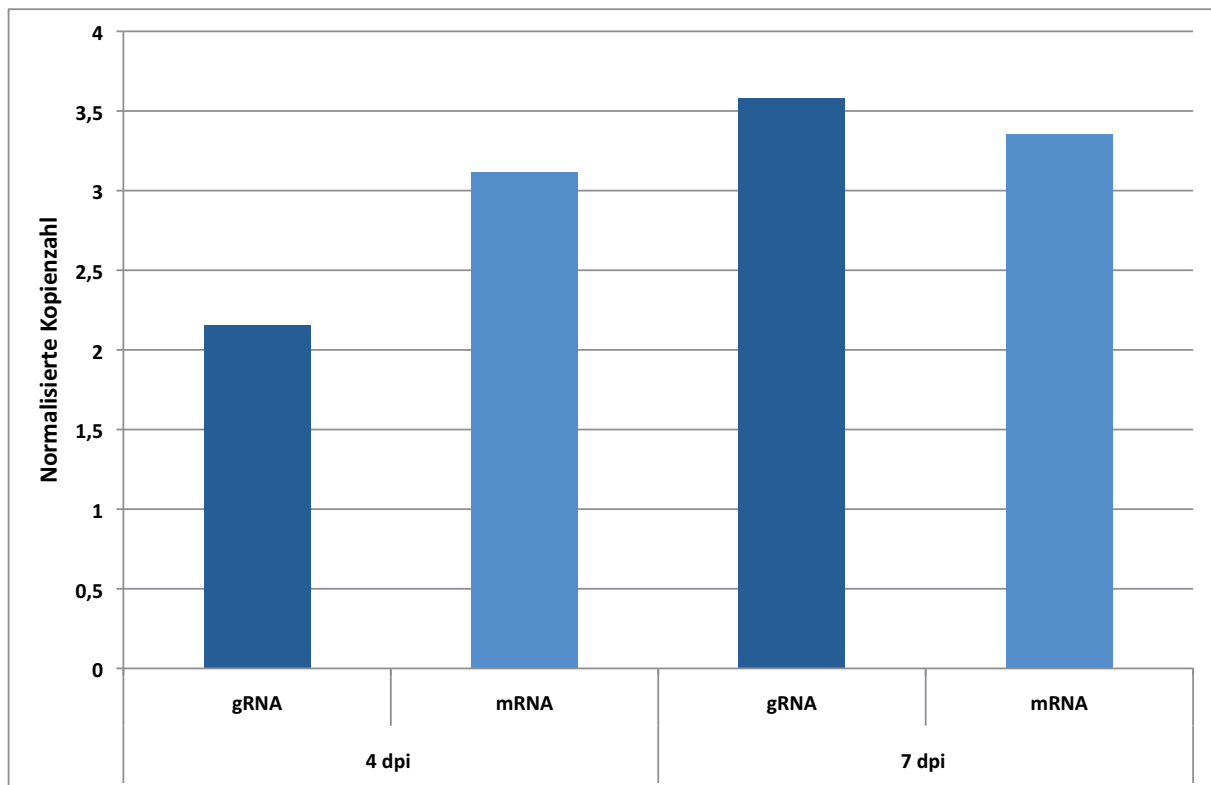
In der reinen Kultur der olfaktorischen Hüllzellen konnten 4 Tage nach der BDV-Infektion durchschnittlich 94,23 Kopien BDV-N-spezifische genomische RNA pro Kopie GAPDH detektiert werden. Die Kopienzahl der mRNA lag bei 96,13 pro Kopie GAPDH. Das Verhältnis genomische zu mRNA wurde mit 1:1,02 berechnet. 7 Tage nach der Infektion lag dieses Verhältnis bei 1:1,48. Es waren rund 75,64 Kopien gRNA/Kopie GAPDH in der qPCR nachweisbar. Die durchschnittliche Kopienzahl der mRNA lag bei 111,61. Dies ist in Abb. 41 zu sehen.

Abb. 41: Nachweis BDV-N-spezifischer genomischer RNA und mRNA in der Kultur der olfaktorischen Hüllzellen

x-Achse: genomische RNA (gRNA) und messenger RNA (mRNA) zu den Untersuchungszeitpunkten 4 und 7 Tage nach der Infektion; y-Achse: normalisierte Kopienzahl; dpi: *days post infection*; OE: olfaktorisches Epithel; OEC: olfaktorische Hüllzellen

Bei einem Mischungsverhältnis von 3 Teilen Kultur des olfaktorischen Epithels zu 1 Teil Kultur der olfaktorischen Hüllzellen fanden sich 4 Tage nach der Infektion durchschnittlich 2,15 Kopien genomische RNA pro Kopie GAPDH. Der Wert für die mRNA lag bei 3,11 Kopien. Hieraus konnte das Verhältnis 1:1,45 gRNA zu mRNA gebildet werden. 7 Tage nach der Infektion erhöhte sich die Kopienzahl auf 3,58 für die genomische RNA bzw. auf 3,35 für die mRNA pro Kopie GAPDH. Dies entsprach einem Verhältnis von 1:0,94. Die Ergebnisse für dieses Mischungsverhältnis sind in Abb. 42 zu sehen.

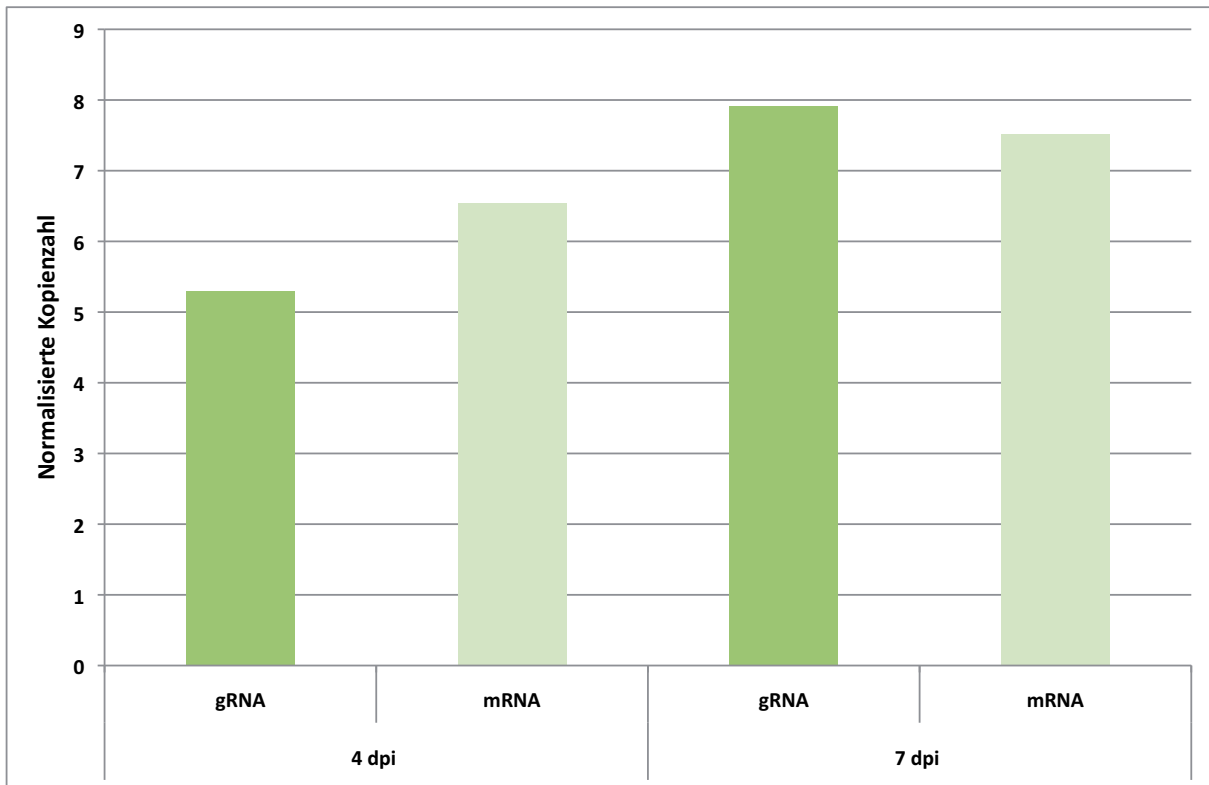
Abb. 42: Nachweis BDV-N-spezifischer genomischer RNA und mRNA der Co-Kultur aus olfaktorischem Epithel und olfaktorischen Hüllzellen im Mischungsverhältnis 3:1



x-Achse: genomische RNA (gRNA) und messenger RNA (mRNA) zu den Untersuchungszeitpunkten 4 und 7 Tage nach der Infektion; y-Achse: normalisierte Kopienzahl; dpi: *days post infection*; OE: olfaktorisches Epithel; OEC: olfaktorische Hüllzellen

Bei dem Mischungsverhältnis 1:1 beider Kulturen lag die Kopienzahl für die gRNA 4 Tage nach der Infektion bei rund 5,3 Kopien pro Kopie GAPDH. Die Kopienzahl für die mRNA lag bei 6,54 Kopien pro Kopie GAPDH. Daraus ließ sich das Verhältnis 1:1,24 berechnen. 7 Tage nach der Infektion konnten durchschnittlich rund 7,92 Kopien gRNA und 7,52 Kopien mRNA pro Kopie GAPDH nachgewiesen werden. Dies entsprach einem Verhältnis von 1:0,95 (Abb. 43).

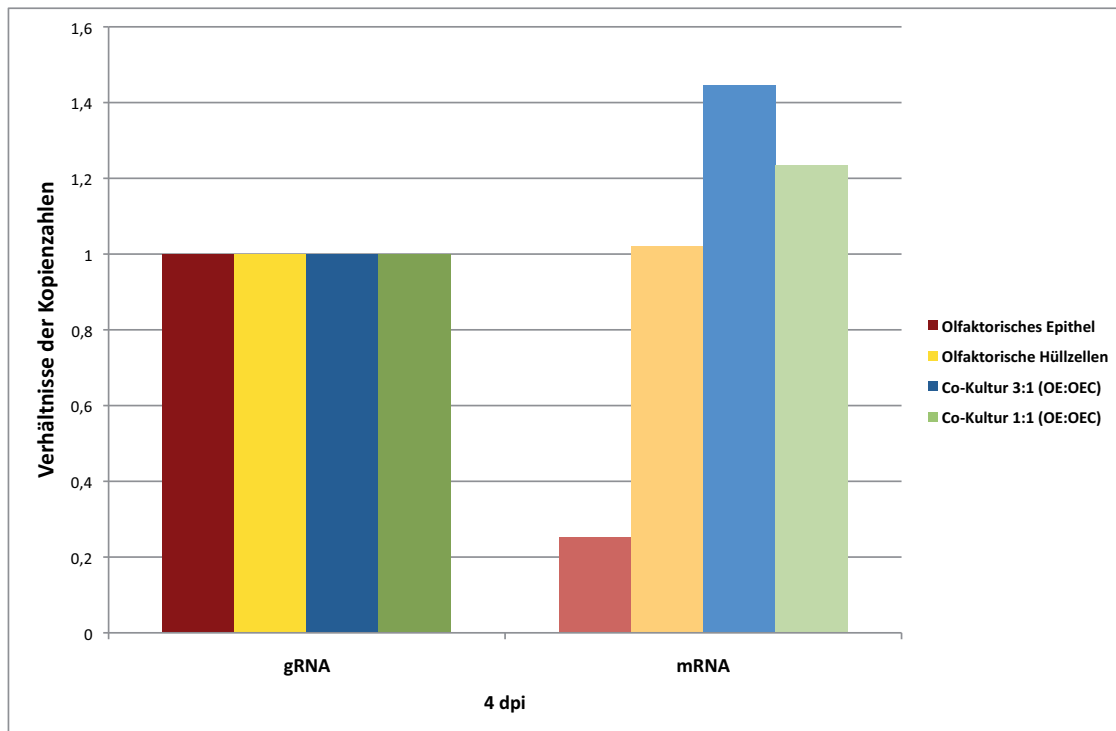
Abb. 43: Nachweis BDV-N-spezifischer genomischer RNA und mRNA der Co-Kultur aus olfaktorischem Epithel und olfaktorischen Hüllzellen im Mischungsverhältnis 1:1



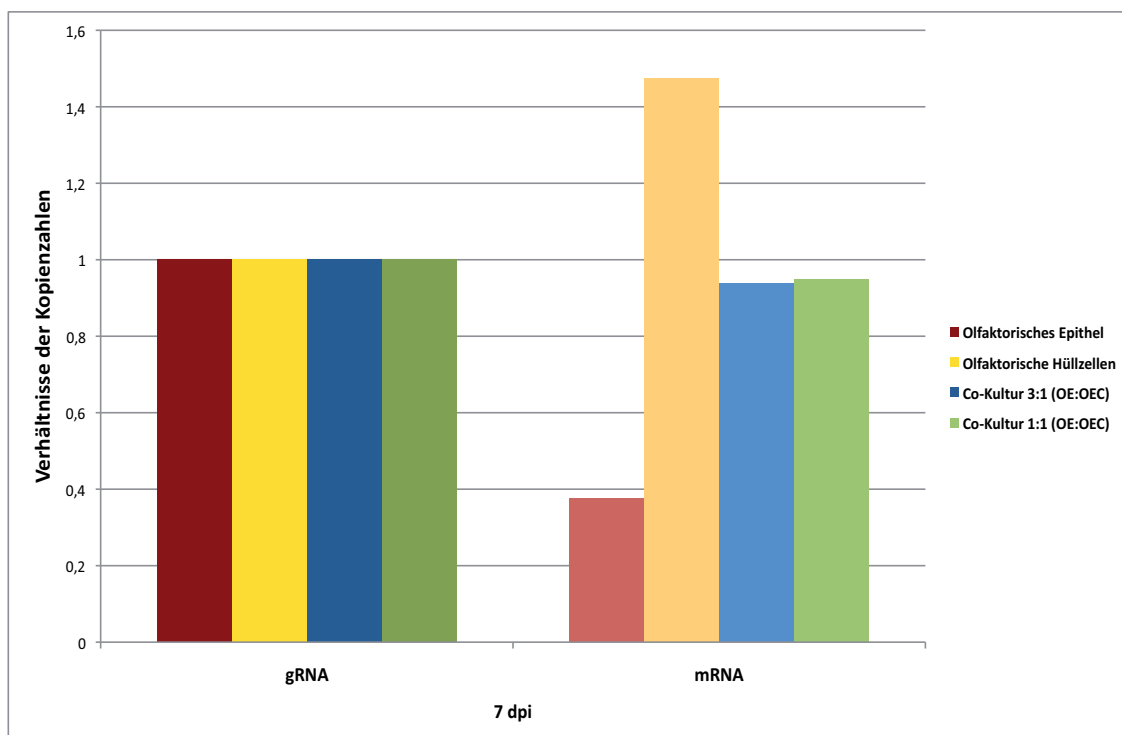
x-Achse: genomische RNA (gRNA) und messenger RNA (mRNA) zu den Untersuchungszeitpunkten 4 und 7 Tage nach der Infektion; y-Achse: normalisierte Kopienzahl; dpi: *days post infection*; OE: olfaktorisches Epithel; OEC: olfaktorische Hüllzellen

4.5.2.4 Zusammenfassender Vergleich

Zur übersichtlicheren Darstellung wurden in den Diagrammen Abb. 44 und Abb. 45 die Kopienzahlen der genomischen und der mRNA ins Verhältnis zueinander gesetzt. Der Wert für die genomische virale RNA wurde gleich 1 gesetzt und das entsprechende Verhältnis der mRNA dazu berechnet. Auffallend war hierbei, dass 4 Tage nach der Infektion in allen untersuchten Kulturansätzen der Anteil der mRNA ebenfalls nahe dem Wert 1 lag oder größer als 1 war. Eine Ausnahme stellte hingegen nur die Kultur des olfaktorischen Epithels dar. Hier lag der Anteil der mRNA mit einem Wert von lediglich 0,25 weit unter dem Wert für die genomische RNA. Am höchsten war der Wert zu diesem Zeitpunkt für die mRNA der Mischkultur in dem Verhältnis 3:1 mit 1,45. Ein ähnliches Bild für die Kultur des olfaktorischen Epithels zeigte sich 7 Tage nach der Infektion. Der Anteil der mRNA im Vergleich zur genomischen RNA lag hier mit 0,38 ebenfalls wieder deutlich unter dem Wert für die genomische RNA. Auffallend hoch, im Vergleich zu den anderen Kulturansätzen, lag diesmal der Wert für die mRNA der olfaktorischen Hüllzellen mit 1,48. Die Werte für die mRNA der beiden Mischkulturen lagen bei einem Wert knapp unter 1.

Abb. 44: Verhältnis genomischer RNA zu mRNA in den Kulturen 4 dpi

x-Achse: genomische RNA (gRNA) und messenger RNA (mRNA); y-Achse: relativer Wert der Kopienzahlen; dpi: *days post infection*

Abb. 45: Verhältnis genomischer RNA zu mRNA in den Kulturen 7 dpi

x-Achse: genomische RNA (gRNA) und messenger RNA (mRNA); y-Achse: relativer Wert der Kopienzahlen; dpi: *days post infection*

5. DISKUSSION

Das olfaktorische Epithel (OE) des Menschen und der Säugetiere stellt ein wichtiges Themengebiet für die Infektionsforschung und alle Teilgebiete der Neurologie dar. Vor allem viele neurotrope Viren und auch andere potentiell schädliche Stoffe können über das Riechepithel aufgenommen werden und so ins Gehirn gelangen. Außerdem gehen Erkrankungen wie die Alzheimersche- oder Parkinsonsche-Krankheit häufig mit dem Verlust des Geruchssinns einher.

Ein Ziel dieser Arbeit war die morphologische Charakterisierung des olfaktorischen Epithels des Pferdes und der Vergleich mit dem der Ratte. Trotz der Relevanz des Geruchssinns für die Haus- und Nutztiere ist bislang nur wenig gesichertes Wissen über Struktur und Funktion in diesen Tierarten vorhanden. So sind über den Aufbau und die Proteinexpression des olfaktorischen Epithels des Pferdes, dem Hauptwirt der Bornaschen Krankheit, nur sehr wenige Studien durchgeführt worden. Im Gegensatz dazu ist das Riechepithel der Ratte, einem seit Jahrzehnten etablierten Tiermodell zum Studium der intranasalen BDV-Infektion, bestens charakterisiert. Nur durch die Kenntnis der Zytoarchitektur und der Proteinexpression auf zellulärer Ebene lassen sich mögliche Infektionswege untersuchen und vergleichen. So können die im Tiermodell gewonnene Erkenntnisse auf die Pathogenese in den natürlichen Wirten übertragen werden, da die intranasale Infektion auch als natürliche Infektionsroute einer BDV-Infektion des Pferdes angenommen wird.

Daneben war es Ziel dieser Arbeit, die initiale Phase der Infektion mit dem BDV zu untersuchen, da diese bislang nur unzureichend charakterisiert ist. So konnte bisher nicht sicher ausgemacht werden, ob es einen oder mehrere spezifische Wirtszellrezeptoren gibt, die die bekannten Unterschiede in der Empfänglichkeit verschiedener Tierspezies bedingen. Auch ob eine initiale Virusreplikation im olfaktorischen Epithel für eine erfolgreiche Virusausbreitung ins Gehirn notwendig ist, ist bislang nicht bekannt. Die genauen Kenntnisse der frühen Phasen der Infektion und der Verbreitung im Körper sind jedoch notwendig, um effiziente Prophylaxe- und Therapiemaßnahmen zu entwickeln.

Weiterhin sollten im Rahmen der Untersuchung der initialen Infektionsphase mit dem BDV *In-Vitro*-Modelle entwickelt werden, die sich als Ersatzmethoden zum Tierversuch eignen.

5.1 CHARAKTERISIERUNG DES OLFAKTORISCHEN EPITHELS DES PFERDES

5.1.1 Lokalisation des olfaktorischen Epithels in der Pferdenase

Es ist bekannt, dass die Riechschleimhaut eine von der Tierart abhängige Fläche auf den Siebbein- und Nasenmuscheln sowie im Bereich des Siebbeins selbst einnimmt (NICKEL *et al.*, 2004; BARRIOS *et al.*, 2014b; BARRIOS *et al.*, 2014c; PATEL und PINTO, 2014). In der

vorliegenden Arbeit wurde festgestellt, dass sich dieser Bereich beim Pferd vornehmlich über die Siebbeinmuskeln erstreckte. Generell war in den gesägten Querschnitten olfaktorisches Epithel in den Querschnitten A bis C zu finden, was den caudalsten Abschnitten der Nasenhöhle entspricht. Bei 3 von 5 Pferden fand sich auch im Querschnitt D, der in etwa dem rostralen Ende der mittleren Nasenmuschel entsprach, Riechschleimhaut. Der Übergang zum respiratorischen Epithel befand sich folglich bei allen untersuchten Pferden in etwa auf Höhe des rostralen Endes der mittleren Nasenmuschel. Dies traf auch auf die dorsale Nasenmuschel zu, die noch weit nach rostral in die Nasenhöhle hervorragte. Diese Ergebnisse widersprechen zum Teil Ergebnissen aus einer vorherigen Studie beim Pferd, in der Teile der Pferdenase licht- und elektronenmikroskopisch aufgearbeitet wurden und in der olfaktorisches Epithel nur in der caudalen Region der Siebbeinmuskeln nahe der Lamina cribriformis zu finden war. Die rostralen Enden der Siebbeinmuskeln waren in dieser Untersuchung von einer durchgehenden Schicht von respiratorischem Epithel bedeckt (KUMAR *et al.*, 2000). Diese Differenzen sind möglicherweise durch Unterschiede in der Probennahme zu erklären. Während Kumar *et al.* nur caudale Bereiche und die rostralen Enden der Siebbeinmuskeln untersuchten, wurden die Siebbeinmuskeln in der vorliegenden Studie vollständig aufgearbeitet. Im Gegensatz zu der Situation beim Hund, wo das Riechepithel in den caudalen 6 bis 7 cm der Nase zu finden ist (BOCK *et al.*, 2009), ist es beim Pferd ca. in den letzten 6 bis 8 cm zu finden. Folglich nimmt es beim Hund ein anteilmäßig größeres Areal ein. Dies spiegelt sich nicht zuletzt in der enormen Riechleistung des Hundes im Vergleich zu anderen Tierarten wider (zusammengefasst bei KAVOI *et al.*, 2010), was in letzter Zeit sogar immer häufiger auch für die Diagnosestellung von einigen Krebsarten genutzt wird (SCHROEDER, 2015; TAVERNA *et al.*, 2015). Auch im anatomischen Vergleich scheint das Riechepithel des Hundes während der Entwicklung besser strukturell modifiziert zu werden als das Riechepithel der Pflanzenfresser, was am Beispiel des Vergleichs von Hund und Schaf anhand von Kriterien wie Anteil der Neurone, Durchmesser der Nervenfasen und Zahl der Zilien auf den dendritischen Endknöpfchen gezeigt wurde (KAVOI *et al.*, 2010).

Der Übergang zwischen olfaktorischem und respiratorischem Epithel des Pferdes erwies sich in der histologischen Untersuchung als fließend. In den Lokalisationen, in denen olfaktorisches Epithel nachweisbar war, wechselten sich diese Bereiche mit respiratorischem Epithel ab. Von caudal nach rostral konnte eine signifikante Abnahme über die 4 Querschnitte, in denen das olfaktorische Epithel vorhanden war, beobachtet werden. Konnte in manchen Bereichen der Nasenmuskeln im ersten Querschnitt noch ein Anteil des OEs von bis zu 100 % gesehen werden, sank dieser Wert teils bis auf 0 im Querschnitt D. Jedoch war nicht nur die Abnahme in rostraler Richtung signifikant, sondern auch die Unterschiede zwischen den Lokalisationen, die von den jeweiligen Querschnitten untersucht wurden. So

waren die Unterschiede im Anteil des olfaktorischen Epithels in den untersuchten Lokalisationen bis auf im Querschnitt D abhängig vom Querschnitt. Umgekehrt waren die unterschiedlichen Anteile des olfaktorischen Epithels in den Querschnitten abhängig von den Lokalisationen 1 bis 4, wobei dies nicht für die Lokalisation 5 untersucht werden konnte, da hier nur bei einem Pferd Riechepithel nachweisbar war. Nur in den hinteren Bereichen der Lamina perpendicularis konnte Riechepithel nachgewiesen werden. Die Nasenhöhle selbst war mit respiratorischem Epithel ausgekleidet. Nur ausnahmsweise konnte hier im Ansatzbereich zu den Nasenmuscheln Riechschleimhaut gesehen werden. Ältere Studien mit Hunden zeigten ein ähnliches Bild, jedoch war in diesen Untersuchungen auch vermehrt Riechschleimhaut in den Seitenbereichen an den Ansatzstellen der *Ectoturbinalia* nachzuweisen (NICKEL *et al.*, 2004).

Insgesamt konnte beim Pferd der größte Anteil des olfaktorischen Epithels auf den drei Nasenmuscheln gefunden werden, wobei eine deutliche Reduktion des olfaktorischen Epithels in rostraler Richtung zu erkennen war und ab etwa dem Ende der mittleren Nasenmuschel nur noch respiratorisches Epithel vorhanden war.

5.1.2 Verteilung der Typen des olfaktorischen Epithels des Pferdes

Schon 1979 wurde von Graziadei und Monti Graziadei gezeigt, dass das olfaktorische Epithel der Ratte einem Regenerationsprozess unterliegt und dass nebeneinander aktive und inaktive Zonen vorliegen (GRAZIADEI und GRAZIADEI, 1979). Von Bock *et al.* (BOCK *et al.*, 2009) wurde erstmalig berichtet, dass beim Hund zwei Typen des Riechepithels nebeneinander existieren und dass diese histologisch und immunhistologisch unterscheidbar sind. Der von Bock *et al.* mit A bezeichnete Typ stellte dabei das reife OE mit großen, runden Neuronen mit prominenten Nukleoli im mittleren Drittel der Zelllagen dar. Der Typ B hingegen wurde als unreif bezeichnet, da dort die kleineren Neurone mit ovalem Zellkern, die im reifen Epithel im basalen Kompartiment zu finden waren, in jeder der Schichten dominierten. Bei den untersuchten Pferden konnte dieses Bild nicht im selben Ausmaß nachvollzogen werden. Es fanden sich jedoch Bereiche, in denen weniger adulte Neurone zu finden waren und das Epithel insgesamt ein eher aufgelockertes Erscheinungsbild aufwies, jedoch schienen die Lage und die Anzahl der unreifen Neurone konstant zu bleiben. Der morphologische Unterschied zwischen den adulten und juvenilen Neuronen konnte jedoch gut nachvollzogen werden. Damit war auch eine Einteilung in die Epitheltypen A und B möglich. Als weiteres Differenzierungskriterium beim Hund wurden die terminalen Knöpfe und Zilien der Dendriten benannt, die nur beim Typ A an der Epitheloberfläche sichtbar hervortraten. Ein ähnliches Phänomen, wenn auch weit weniger ausgeprägt, war bei den untersuchten Pferdenasen vorhanden. Auf der luminalen Seite des Epithels fanden sich bei

dem Typ A viele der oben beschriebenen Zellfortsätze, wohingegen sie bei dem Typ B deutlich weniger ausgeprägt imponierten und der Epithelabschluss eher glatt erschien. Auffällige Unterschiede zwischen den Typen beim Pferd ergaben sich bei der Betrachtung der Anordnung der Zellkerne der adulten Neurone. Im Typ A reichten die Zellkerne der adulten Neuronen fast bis an die Epitheloberfläche und bildeten hier einen unregelmäßigen Abschluss. Im Typ B hielten die Zellkerne der Neuronen einen deutlichen Abstand zur Epitheloberfläche ein und bildeten dabei einen geraden und regelmäßigen Abschluss zum Nasenlumen. Ein weiteres Unterscheidungsmerkmal beim Pferd war, dass das Epithel vom Typ A meist weit mehr als 15 Zelllagen aufwies. Dagegen waren im Typ B meist weniger als 10 Zelllagen zu finden, weshalb die Epitheldicke bei letzterem Typ meist geringer war. Für das olfaktorische Epithel des Hundes traf dies allerdings nicht zu bzw. wurde dieses Merkmal nicht in der Studie von Bock *et al.* beschrieben (BOCK *et al.*, 2009).

Ein möglicher Grund für die unterschiedliche Ausprägung der Differenzierungsmerkmale in den beiden Tierarten kann das Alter der Tiere sein. Während bei Bock *et al.* nur Beagle mit einem Alter zwischen 3,5 und 6 Monaten untersucht wurden, wurden in der vorliegenden Studie ausschließlich adulte Pferde zwischen 3 und 21 Jahren verwendet. Es ist denkbar, dass die jungen Hunde noch mehr Bereiche des unreifen olfaktorischen Epithels besitzen als die adulten Pferde, wo das Epithels zwar auch dem natürlichen Prozess der stetigen Regeneration und Proliferation unterliegt, dieser aber weniger ausgeprägt sein kann als der Reifungsprozess beim jungen Tier. Allerdings wurden in einer Studie von Barrios *et al.* (BARRIOS *et al.*, 2014c) Hunde verschiedener Altersstufen, darunter Feten und Neonaten sowie adulte Tiere untersucht und das Vorhandensein der zwei Epitheltypen generell in Frage gestellt. Vor dem Hintergrund der fehlenden immunhistologischen Untersuchungen in dieser Arbeit (BARRIOS *et al.*, 2014c), wie sie von Bock *et al.* durchgeführt wurden, ist diese Aussage zu hinterfragen. Darüber hinaus wurde von Bock *et al.* die gesamte Nase systematisch in Querschnitten aufgearbeitet, die Studie von Barrios *et al.* hatte hingegen die Suche nach dem Septalorgan und dem Grüneberg-Ganglion zum Ziel, was zum Teil in einer anderen Präparationsweise resultierte.

Hinsichtlich der Verteilung in der Nase wurde von Bock *et al.* (BOCK *et al.*, 2009) berichtet, dass das reife Epithel des Typs A vermehrt in der Nähe des Lamina cribriformis zu finden war, was gleichbedeutend mit dem caudalsten Bereich von ca. 1 cm Breite gleichzusetzen war. Beim Pferd konnte der Typ A auch weiter rostral gefunden werden, jedoch in abnehmender Menge. Mit einer dreifaktoriellen Varianzanalyse wurde untersucht, in welchen Querschnitten und in welchen Lokalisationen der Pferdenase welcher Typ des olfaktorischen Epithels dominierte. Es konnte bestätigt werden, dass bei globaler Betrachtung die unterschiedlichen Mengen der Typen A und B des olfaktorischen Epithels sowohl vom Querschnitt als auch von der Lokalisation abhängig waren und demnach eine dreifache

Wechselwirkung bestand. Bei Betrachtung der gesamten Pferdenase waren diese Unterschiede allerdings knapp nicht signifikant ($p=0,0697$). Mit Hilfe des exakten Friedman-Tests konnte darüber hinaus gezeigt werden, dass die für das gesamte olfaktorische Epithel ermittelten Wechselwirkungen zwischen Lokalisation und Querschnitt und die Unterschiede in den einzelnen Komponenten vor allem durch die signifikanten Wechselwirkungen und Abhängigkeiten speziell des Epitheltyps A bedingt waren. Weiterhin wurde so bestätigt, dass Wechselwirkungen zwischen den Querschnitten und den Epitheltypen für die dorsalen, mittleren und ventralen Bereichen der Nasenmuscheln vorhanden waren, welche durch die Abhängigkeit der ermittelten Unterschiede in den Querschnitten vom Epitheltyp A bedingt waren. Außerdem wurden so die Wechselwirkungen zwischen Lokalisation und Epitheltyp für die Querschnitte A und B statistisch abgesichert, die durch die Abhängigkeit der Unterschiede in den Lokalisationen von den Epitheltypen A und B bedingt waren.

Insgesamt fand sich eine deutliche Abnahme für den Typ A nur in rostraler Richtung. Eine umgekehrt proportionale Zunahme des Typs B war aber nicht vorhanden. Der Anteil des Typs B veränderte sich im Bereich der Nasenmuscheln in den ersten 3 Querschnitten nur geringfügig. In den rostralen Bereichen der Nase, in denen noch olfaktorisches Epithel zu detektieren war, änderte sich das Verhältnis von Typ A deutlich zugunsten des Typs B, sodass ab dem Querschnitt C der Typ B in den mittleren und ventralen Anteilen der Nasenmuschel überwog. Wie auch bei der Betrachtung des Riechepithels als Ganzes, waren die Typen A und B nur auf dem Nasenseptum des Querschnitts A gut ausgeprägt zu finden, wohingegen im Querschnitt B jeweils nur geringe Anteile der Typen in dieser Lokalisation zu finden waren. Demnach nahm auch in dieser Lokalisation der Gehalt des olfaktorischen Epithels von caudal nach rostral signifikant ab.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass auch beim Pferd zwei Typen des olfaktorischen Epithels gefunden werden konnten, die ähnliche morphologischen Kriterien wie beim Hund und weitere Unterscheidungsmerkmale aufwiesen. Wie auch für das gesamte olfaktorische Epithel konnte eine Abnahme beider Typen in rostraler Richtung festgestellt werden, die für den Typ A stärker ausgeprägt war, sodass ab dem Querschnitt C der Typ B dominierte.

5.1.3 Immunhistologische Untersuchung des olfaktorischen Epithels des Pferdes

Untersucht wurden vier ausgewählte Marker zur Darstellung der adulten und juvenilen olfaktorischen Neurone sowie deren Vorläufer, der horizontalen und proliferierenden Basalzellen. Vorab war bekannt, dass sie in anderen Tierarten wie Ratte, Maus und Hund oder im Menschen die entsprechenden Zellen zuverlässig markieren. Außerdem wurden weitere Marker zur Darstellung neuronaler Komponenten getestet.

Als zuverlässigster und spezifischster Marker zur immunhistologischen Markierung der reifen olfaktorischen Neurone wurde in zahlreichen vorangegangenen Studien (HARTMAN und MARGOLIS, 1975; FARBMAN und MARGOLIS, 1980) und in eigenen Vorversuchen *Olfactory marker protein* (OMP) bestätigt. Es handelt sich hierbei um ein zwischen den Spezies stark konserviertes Protein (BUIAKOVA *et al.*, 1994), dessen genaue Funktion noch nicht bekannt ist. Eine essentielle Aufgabe bei der Signaldetektion und Signaltransduktion des Riechens wird angenommen (BUIAKOVA *et al.*, 1996; REISERT *et al.*, 2007).

Die markierten Neurone waren beim Pferd in der vorliegenden Studie durch eine granuläre bis diffuse Färbung des Kerns und des Dendriten, der apikal in das Lumen der Nasenhöhle vorragte, und seltener durch eine ausschließliche Färbung des Zytoplasmas gekennzeichnet. Dies entsprach dem beschriebenen Reaktionsmuster anderer Studien (FARBMAN und MARGOLIS, 1980; KOO *et al.*, 2004; BOCK *et al.*, 2009). Jedoch liegen auch Berichte über eine vornehmlich zytoplasmatische Immunreaktion bei Ratten und Mäusen vor (BUIAKOVA *et al.*, 1994; BUIAKOVA *et al.*, 1996; WEILER und BENALI, 2005), wobei auch in der vorliegenden Arbeit eine deutliche nukleäre Reaktion neben der Zytoplasmareaktion im olfaktorischen Epithel der Ratte gesehen werden konnte. Ein Einfluss auf die Unterschiede in den positiven Zellkompartimenten durch die Wahl des Antikörpers und durch eine abweichende histologische Aufarbeitung des Gewebes ist nicht auszuschließen. Eine Funktionsänderung von OMP während der Reifung des Epithels wurde von Bock *et al.* vorgeschlagen, da beim Hund die nukleäre Reaktion im reifen Epithel Typ A und die zytoplasmatische Reaktion im unreifen Epithel Typ B dominierte. In der vorliegenden Studie konnte diese klare Abgrenzung nicht immer nachvollzogen werden. Eine Tendenz, dass im olfaktorischen Epithel Typ B die zytoplasmatische Reaktion häufiger zu finden war, war auch beim Pferdeepithel zu erkennen.

Von caudal nach rostral konnte in den Pferdenasen der vorliegenden Studie eine signifikante Reduktion der OMP-Expression in den Epithelabschnitten beobachtet werden, die morphologisch eindeutig dem olfaktorischen Epithel zuzuordnen waren. Signifikant war beim Pferd außerdem die stärkere Expression in den Nasenmuscheln als im Nasenseptum oder in der epithelialen Auskleidung des Cavum nasi. Ein Vergleich mit anderen Tierarten ist nur bedingt möglich, da in anderen Studien meist nur die Nasenmuscheln untersucht wurden und die Begrenzung der Nasenhöhle sowie das Nasenseptum nicht in die Untersuchung mit einbezogen wurden bzw. hierüber nichts berichtet wurde. In der Studie von Bock *et al.* wird von einer schwächeren Expression vom OMP im olfaktorischen Epithel Typ B berichtet, welcher in den rostralen Querschnitten der Nasen dominiert. Folglich ist auch hier eine Reduktion der OMP-Expression in rostraler Richtung anzunehmen. Die geringere Zahl von OMP-positiven Zellen in den rostralen Anteilen der Nase kann möglicherweise darauf beruhen, dass die freiliegenden Nervenzellen in den caudalen Abschnitten der Nase bzw. in

den Siebbeinmuskeln besser gegen Krankheitserreger geschützt liegen und deshalb rostral weniger Zellen zu funktionsfähigen Neuronen heranreifen. Für die Maus ist bekannt, dass OMP exprimiert wird, sobald die Nervenzellen Kontakt zum Bulbus olfactorius haben (GRAZIADEI *et al.*, 1980), die Signale also auch weitergeleitet werden können.

Der Marker *Doublecortin* (DCX) hat sich in zahlreichen Studien als geeigneter Marker zur Darstellung juveniler Neurone erwiesen, in denen das Protein an die Mikrotubuli bindet (BROWN *et al.*, 2003; CARSON *et al.*, 2006; MURDOCH und ROSKAMS, 2007). DCX wurde zur Markierung der juvenilen Neurone auch in der vorliegenden Studie verwendet. Diese lagen weiter basal im Epithel als die adulten Neurone und zeichneten sich durch einen eher längsovalen Kern aus. Immunhistologisch war eine hellbraune, gleichmäßige Anfärbung des Zellkerns und des Zytoplasmas zu beobachten. Auch bei diesem Marker konnte eine Markierung des in Richtung der Nasenhöhle ragenden Dendriten verzeichnet werden, der aber die Epitheloberfläche nicht erreichte. Wie auch bei OMP konnte ein signifikanter Unterschied zwischen den Lokalisationen festgestellt werden. So fand sich eine deutliche Reduktion des Anteils der DCX-positiven Zellen im Bereich der Lamina perpendicularis von Querschnitt A zu Querschnitt B. Eine deutliche Abnahme der positiven Epithelabschnitte im Bereich der Nasenmuskeln konnte in den Querschnitten A bis C nicht beobachtet werden. Eine Reduktion konnte hier erst in Querschnitt D gesehen werden. Dies spricht dafür, dass in den drei am weitesten caudal liegenden Querschnitten vergleichbare Mengen an unreifen Neuronen vorhanden waren, was wiederum ein Zeichen für die stetige Zellerneuerung des Epithels ist. Die Reduktion der DCX-positiven Epithelabschnitte im Querschnitt D passt zu der Reduktion reifer, OMP-positiver Neurone in den rostralen Abschnitten der Nase, da sich diese aus den juvenilen Neuronen entwickeln. Es ist denkbar, dass sich in den stärker exponierten Regionen weniger Neurone entwickeln und ausdifferenzieren, was möglicherweise einen Schutz vor eindringenden Erregern über diese Zellen bietet.

Zur Darstellung der proliferierenden Basalzellen wurde *Proliferating cell nuclear antigen* (PCNA) verwendet. In den meisten Studien, die sich mit dem Riechepithel befassen, wurde der Marker Ki-67 verwendet, der auch häufig in der Humanmedizin Verwendung findet (CARTER *et al.*, 2004; BOCK *et al.*, 2009; HOLBROOK *et al.*, 2011). Beide Marker eignen sich zur Darstellung in Teilung begriffener Zellen, wobei Ki-67 nur in den aktiven Phase des Zellzyklus nachweisbar ist und PCNA eine wichtige Rolle während der DNA-Replikation in der S-Phase inne hat (CELIS *et al.*, 1987; SCHOLZEN und GERDES, 2000; OHTA und ICHIMURA, 2001). Da das Vorkommen von PCNA in der Pferdenase bereits in einer früheren Studie untersucht wurde (MILLER *et al.*, 2003) und der Marker Ki-67 weder beim Pferd noch bei der Ratte zuverlässige Ergebnisse lieferte, fiel die Entscheidung für PCNA, um Vergleiche zwischen den Ergebnissen zu ermöglichen. Im Vergleich von allen untersuchten Markern, die mit in die statistische Auswertung einbezogen wurden, war die

Zahl positiver Zellen für PCNA am geringsten. Die immunhistologische Reaktion war durch eine fleckige oder gleichmäßige Anfärbung ausschließlich des Zellkerns gekennzeichnet. Meist fanden sich nur wenige markierte Zellen im olfaktorischen Epithel, die vielfach in kleinen Gruppen zusammenlagen. Dies entsprach der Vorstellung, dass Bereiche in denen eine Erneuerung der Zellen stattfindet, sich mit ruhenden Bereichen abwechseln (GRAZIADEI und GRAZIADEI, 1979). Auch dass nur einzelne Zellen markiert wurden, entsprach bereits vorangegangenen Studien (MILLER *et al.*, 2003). Wie bei den bisher in der vorliegenden Studie beschriebenen Markern auch, ließ sich ein signifikanter Unterschied in der Expression hinsichtlich der Lokalisationen feststellen. Während in den hinteren drei Querschnitten in den Nasenmuscheln eine nahezu konstante Expression vorlag, konnten im Bereich des Nasenseptums nur im Querschnitt A wenige PCNA-positive Zellen gesehen werden. Im Bereich der Auskleidung der Nasenhöhle fanden sich keine PCNA-positiven Zellen. In dem am weitesten rostral gelegenen Querschnitt lag eine signifikante Reduktion des Markers vor. Dies entsprach ebenfalls den Beobachtungen bei den Markern OMP und DCX. Im Querschnitt D fand sich bei den Pferden der Übergang zur Region mit rein respiratorischem Epithel, wobei nur die PCNA-positiven Zellen des olfaktorischen Epithels mit in die Auswertung einbezogen wurden. Die vorliegenden Ergebnisse weisen darauf hin, dass die Proliferation des vorhandenen olfaktorischen Epithels in diesem Bereich reduziert war, was sich dementsprechend in einer Reduktion der positiven Zellen äußerte. Die rostralen Regionen der Nase sind vermutlich stärker für schädigende Einflüsse exponiert als die caudalen Regionen, weshalb eine stärkere Proliferation bzw. bei einer Schädigung Regeneration erwartet werden könnte. Dies scheint jedoch nicht, zumindest nicht für den Querschnitt D, der Fall zu sein. Möglicherweise werden hier nur wenige Zellen ausdifferenziert, da in diesen Regionen vermehrt mit Noxen zu rechnen ist. Im Querschnitt C war allerdings eine Reduktion der OMP-positiven Epithelabschnitte bei nahezu gleichbleibendem Anteil DCX- und PCNA-positiver Epithelabschnitte zu finden, was auf eine verhältnismäßig stärkere Proliferation als Reaktion auf die exponiertere Lage hinweisen kann.

Zur Darstellung der horizontalen Basalzellen wurde Tyrosinkinase-Rezeptor-A (TrkA), der hochaffine Rezeptor für den Nervenwachstumsfaktor (*Nerve growth factor*, NGF), genutzt, welcher bereits in anderen Studien zur Charakterisierung des olfaktorischen Epithels verwendet wurde (FERON *et al.*, 2008). Außerdem wurde TrkA bereits im Vomeronasalorgan des Pferdes erfolgreich eingesetzt (GARCIA-SUAREZ *et al.*, 1997). In der Immunhistologie des olfaktorischen Epithels des Pferdes zeigte sich eine granuläre Zytoplasmareaktion oder eine ringartige Anfärbung der Zellmembran. Eine Anfärbung der Basalzellen konnte in einer anderen Studie auch für das sensorische Epithel des Vomeronasalorgans des Pferdes gezeigt werden, das dem olfaktorischen Epithel sehr

ähnlich ist (GARCIA-SUAREZ *et al.*, 1997). Auch von Garcia-Suarez *et al.* konnte eine supranukleäre Anfärbung der Neurone und Stützzellen gefunden werden, wie sie auch in der vorliegenden Arbeit im olfaktorischen Epithel des Pferdes vorkam. Von Garcia-Suarez *et al.* wurde jedoch diskutiert, dass der verwendete Antikörper, der nicht spezifisch für den equinen TrkA ist, im Western Blot nur ein Proteinfragment erkennt. Da jedoch die C-Terminal-Domäne und die Expression bei verschiedenen Tierarten als stark konserviert gelten, wurde geschlussfolgert, dass die immunhistologische Reaktion spezifisch ist. Hinsichtlich des Anteils positiver Epithelabschnitte ergab sich ein ähnliches Bild wie bei DCX. In den ersten drei Querschnitten (A bis C) fand sich in den drei Lokalisationen der Nasenmuscheln beim Pferd eine nahezu konstante Expression von TrkA. Die Unterschiede im Anteil des positiven Epithels zwischen den Nasenmuscheln und der Lamina perpendicularis, wo nur im ersten Querschnitt ein hoher Anteil detektiert werden konnte, entsprechen den Markern OMP und DCX. Auch bei TrkA konnte im Querschnitt D eine deutliche Reduktion der Markerexpression ermittelt werden.

Die Abnahme der positiven Epithelabschnitte in den rostralen Bereichen der Nasen der untersuchten Pferde kann möglicherweise mit dem Gehalt des olfaktorischen Epithels zusammen hängen. Dieser nimmt von caudal nach rostral ab. Es ist möglich, dass rostral vermehrt Bereiche, die morphologisch noch sicher als olfaktorisches Epithel erkannt wurden, bereits in geringem Ausmaß mit Zellen des respiratorischen Epithels durchsetzt waren. Diese Epithelabschnitte, die nicht klar als Übergangsbereiche erkennbar waren, haben entsprechend eine geringere Zahl positiver Zellen. Außerdem ist denkbar, dass sich die Zellen in den rostralen Bereichen, die vermutlich stärker schädigenden Einflüssen ausgesetzt sind, nicht oder schlechter ausdifferenzieren.

Nicht mit in die statistische Auswertung miteinbezogen wurden die Marker NSE, NeuN und TH, da ihre Spezifität nicht ausreichend gesichert werden konnte. Insbesondere fiel bei NSE die Markierung einiger Kerne der Riechnervenzellen auf, was jedoch nur regelmäßig beim jungen Tier beobachtet wird (WEILER und BENALI, 2005).

5.1.4 Immunhistologische Untersuchung der Typen des olfaktorischen Epithels

Durch die histologische Untersuchung konnte festgestellt werden, dass die Anzahl an reifen Riechnervenzellen im Epithel Typ A deutlich größer war als im Typ B und dass in Typ A eine größeren Anzahl von Epithelreihen vorlag. Oft konnte zudem beobachtet werden, dass in der immunhistologischen Untersuchung im Typ B die zytoplasmatische Anfärbung von OMP gegenüber der Anfärbung des Kerns überwog. Von Bock *et al.* wurde diskutiert, dass es so möglicherweise zu einer Funktionsänderung von OMP kommt. Unklar ist jedoch wie sich diese äußern würde. Bereiche, die zuvor durch ihre Morphologie sicher als Riechschleimhaut

identifiziert wurden, wiesen stets eine gut erkennbare Expression des Markers OMP auf. Bereiche, die wie von Bock *et al.* (BOCK *et al.*, 2009) beschrieben kaum OMP-Expression zeigten und alleinig dem Typ B zuzuordnen waren, fanden sich beim Pferd nicht. Es ist denkbar, dass dies zum Teil durch den Altersunterschied der untersuchten Tiere zu erklären ist. Die in der Studie von Bock *et al.* verwendeten Hunde waren erst wenige Monate alt, wohingegen die in dieser Studie untersuchten Pferde durchweg älter waren. So kann man vermuten, dass diese jungen Tiere vermehrt Abschnitte mit deutlich unreiferem Epithel besaßen als die untersuchten adulten Pferde. Die in der vorliegenden Studie untersuchten Pferde wiesen eine Altersverteilung zwischen 3 und 21 Jahren auf. Weder beim jüngsten noch beim ältesten Tier waren Auffälligkeiten hinsichtlich der Expression von einem der verwendeten Marker nachzuweisen. Daher scheint sich das olfaktorische Epithel in der untersuchten Altersspanne gleich zu verhalten. Um den Einfluss des Alters auf den Reifegrad des olfaktorischen Epithels abschließend zu beurteilen, sollten in weiterführenden Studien auch jüngere Pferde untersucht werden.

Um zu überprüfen, ob einer der untersuchten Marker stärker in einem der Epitheltypen exprimiert wird, wurde der Rangkorrelationskoeffizient r_s nach Spearman bestimmt. Alle ermittelten Werte waren dabei hoch signifikant ($p < 0,0001$). Für alle untersuchten Marker und Epitheltypen konnte ein deutlicher und zum Teil auch ein sehr starker Zusammenhang zwischen dem Anteil der positiven Epithelabschnitte und dem jeweiligen Epitheltyp bestimmt werden. Der höchste Wert wurde für OMP und den Typ A mit 0,949 ermittelt. Der Wert für den Typ B lag geringfügig niedriger. Dies spricht für eine vermehrte Expression von OMP im olfaktorischen Epithel Typ A im Vergleich zum Typ B. Ein vergleichbares Bild ergab sich für DCX. Auch hier zeigte sich eine stärkere Korrelation mit dem Typ A, auch wenn für den Typ B mit 0,876 noch eine starke Korrelation ermittelt werden konnte. Folglich wurde der Marker DCX auch in mehr Zellen im olfaktorischen Epithel Typ A als im Typ B exprimiert. Bei den Markern PCNA und TrkA zeigte sich ein umgekehrtes Bild. Hier war stets eine stärkere Korrelation, und damit auch Expression, des Markers mit dem Typ B zu finden. Die Werte für PCNA lagen zwar niedriger als die Werte für die anderen Marker, jedoch konnte auch hier noch von einer deutlichen Korrelation gesprochen werden. Am stärksten kam der Unterschied bei TrkA zu tragen. Hier wurde für den Typ A ein Wert von 0,784 und für den Typ B ein Wert von 0,876 notiert. Dies passt zu der Annahme, dass es sich bei dem Typ B um den unreifen Typ des Epithels handelt, wie von Bock *et al.* (BOCK *et al.*, 2009) vorgeschlagen. In diesem Typ schienen vermehrt die untersuchten Proteine der Vorläuferzellen exprimiert zu werden, wohingegen die Marker für die adulten und die juvenilen Neurone im Typ A dominierten. Dies bestätigt, dass die von Bock *et al.* gezogenen Schlüsse, dass das olfaktorische Epithel Typ B die unreife Variante darstellt, nicht nur für den Hund, sondern auch für das Pferd zutreffend sind. Trotzdem ließen sich nicht alle

beobachteten morphologischen Kriterien und Ergebnisse der Immunhistologie vom Hund auf das Pferd übertragen.

5.1.5 Speziesübergreifende Betrachtung

Insgesamt konnte festgestellt werden, dass das olfaktorische Epithel des Pferdes hinsichtlich seiner Zytoarchitektur sehr stark dem anderer Säugetiere, darunter Nagetiere und Hunde, sowie dem des Menschen ähnelte. Unterschiede in der Architektur der beiden Untertypen zwischen Hund und Pferd können, wie bereits diskutiert, von dem unterschiedlichen Altersdurchschnitt der Tiere herrühren. So wiesen die bei Bock *et al.* für den Typ B des olfaktorischen Epithels des Hundes beschriebenen Neuronen eher einen ovalen statt runden Kern auf und die Zilien der Endknöpfchen der Dendriten waren nur im Typ A erkennbar. Beim Pferd waren beide Punkte nur in Ansätzen nachzuvollziehen. Während beim Hund in den verschiedenen Epitheltypen unterschiedliche Zellkompartimente mittels OMP markiert wurden, waren beim Pferd in beiden Epitheltypen stets Kern und Zytoplasma angefärbt. Nur eine Tendenz zum Überwiegen der zytoplasmatischen Reaktion in Typ B war erkennbar. Abschnitte, in denen eine starke Reduktion der OMP-Expression bei gleichzeitiger starker Zunahme der juvenilen Neurone zu finden war, wie sie für den Hund beschrieben wurden, fanden sich beim Pferd nicht. Signifikante Unterschiede in der Zahl proliferierender Basalzellen in den Typen A und B wurden beim Pferd nicht beobachtet, jedoch konnte mittels des Rangkorrelationskoeffizienten nach Spearman eine geringfügig stärkere Korrelation dieses Markers mit dem Epithel Typ B ermittelt werden. Beim Pferd waren Kriterien wie die Dicke des Epithels, die aus der Zahl der adulten Neurone resultierte und die Anordnung der Zellkerne in der apikalen Epithelregion wichtige Unterscheidungskriterien. Möglicherweise traten die von Bock *et al.* beschriebenen und vom adulten Pferd abweichenden Charakteristika beim jungen Hund deutlicher hervor. Die systematische Untersuchung des olfaktorischen Epithels des Fohlens kann an diesem Punkt weiter zur Aufklärung beitragen. Bisher fand die Untergliederung des Riechepithels in zwei Typen in der Literatur nur wenig Beachtung oder wurde für den Hund in einer späteren Studie in Frage gestellt (BARRIOS *et al.*, 2014c). Meist wird mit kleinen Nasen von Nagetieren gearbeitet, wo das Nebeneinander von zwei unterschiedlich ausgeprägten Erscheinungsbildern des olfaktorischen Epithels möglicherweise weniger stark imponiert. Außerdem beschäftigen sich neuere Studien zumeist mit einigen wenigen Zelltypen (HEMPSTEAD und MORGAN, 1983; WEILER und FARBMAN, 1998b; OHTA und ICHIMURA, 2001) oder Proteinen (CELIS *et al.*, 1987; BUIAKOVA *et al.*, 1996; CARSON *et al.*, 2006) sowie dem Phänomen der lebenslangen Neurogenese (GRAZIADEI und GRAZIADEI, 1979; CALOF und

CHIKARAISHI, 1989; FERON *et al.*, 1999; CALOF *et al.*, 2002; CHEN *et al.*, 2004), sodass der globale Blick auf die Zytoarchitektur des Epithels oft sehr oberflächlich ausfällt.

Der verwendete Antikörper gegen das *Olfactory marker protein* lieferte zuverlässige Resultate beispielsweise beim Hund (BOCK *et al.*, 2009), beim Schaf (BARRIOS *et al.*, 2014b) und in der vorliegenden Arbeit auch beim Pferd und bei der Ratte. Dies stimmt mit der Beobachtung überein, dass es sich bei OMP um ein Protein handelt, das bei vielen unterschiedlichen Spezies vorkommt und konservierte Genomabschnitte aufweist (KELLER und MARGOLIS, 1975; BUIAKOVA *et al.*, 1994). Im Falle einer Deletion, wie am Beispiel eines Mausmodells gezeigt (BUIAKOVA *et al.*, 1996), kommt es zu einer gestörten Reaktion auf Riechreize, wobei sowohl die Aktivität der Nerven im olfaktorischen Epithel selbst als auch die der Nervenfasern des Riechnervs gestört ist.

Auch für DCX und TH konnten in den Spezies Ratte und Pferd übereinstimmende Ergebnisse in der Immunhistologie erzielt werden, was bedeutet, dass bei diesen Spezies eine vergleichbare Expression von DCX und TH stattfindet.

Ein Grund dafür, dass bei der Ratte mehr PCNA-positive Zellen zu finden waren als beim Pferd, könnte das Alter der Tiere sein oder es kann sich auch um einen altersunabhängigen tierartigen Unterschied handeln. Die Ratten wurden im Alter von ca. 4 Wochen verwendet. Zu diesem Zeitpunkt waren die Tiere zwar bereits immunologisch kompetent, jedoch noch nicht adult. Die für die Ratte ermittelten Werte liegen in der gleichen Größenordnung wie die Werte der proliferierenden Basalzellen der juvenilen Hunde, die mittels Ki-67 markiert wurden (BOCK *et al.*, 2009) und der Ratten einer anderen Studie, die mittels BrdU markiert wurden (WEILER und FARBMAN, 1998b). Die ermittelten Werte für die Pferdenasen in der vorliegenden Studie entsprachen denen anderer Pferde aus anderen Studien (MILLER *et al.*, 2003). Für die Tierart Ratte konnte bereits gezeigt werden, dass das Alter eine entscheidende Rolle bei der Proliferation des olfaktorischen Epithels spielt (WEILER und FARBMAN, 1998a, b), weshalb auch beim Vergleich von Ratte und Pferd in der vorliegenden Studie die Altersabhängigkeit einen entscheidenden Faktor darstellen dürfte.

Entgegen der Beobachtungen von Feron *et al.* (FERON *et al.*, 2008), war TrkA in der vorliegenden Arbeit nicht regelmäßig in den horizontalen Basalzellen und Stützzellen der Ratte nachweisbar. Dies war hier nur für das Pferd möglich. Da auch in anderen Studien das Vorhandensein dieses Tyrosinkinase-Rezeptors im olfaktorischen Epithel der Ratte beschrieben wurde (ROSKAMS *et al.*, 1996; YASUNO *et al.*, 2000), kann nicht ausgeschlossen werden, dass der Nachweis im vorliegenden Fall aufgrund von Unterschieden in der histologischen Aufarbeitung des Gewebes nicht gelang. Zur Darstellung der horizontalen Basalzellen wurde für die Ratte im regenerierenden olfaktorischen Epithel die Verwendung von NGF, dem Ligand von TrkA, beschrieben

(ROSKAMS *et al.*, 1996). Darüber hinaus eignen sich bei der Ratte auch Marker für Pan-Keratin (FERON *et al.*, 2008) oder Zytokeratin 5 und 6 (SCHWOB *et al.*, 1995).

Weder beim Pferd noch bei der Ratte konnte für den Marker NSE die typische zytoplasmatische Braunfärbung in der Immunhistologie detektiert werden. Eine nukleäre Reaktion wie in der vorliegenden Arbeit ist nur bei Jungtieren beschrieben (WEILER und BENALI, 2005). Bei den in der vorliegenden Studie verwendeten Tieren handelte es sich allerdings um ältere Pferde und Ratten. Da die Spezifität nicht abschließend gesichert werden konnte, wurde auf die Verwendung des Markers verzichtet.

Für NeuN ergaben sich im tierartigen Vergleich abweichende Ergebnisse. Die beim Pferd gefundene Markierung der Zellkerne entsprach den erwarteten Ergebnissen. Bei der Ratte hingegen wurden nur die Dendriten der adulten olfaktorische Neurone markiert. In anderen Studien wurde bestätigt, dass NeuN im olfaktorischen Epithel unzuverlässig die Neurone markiert, während sich die Verwendung im ZNS bewährt hat (WEILER und BENALI, 2005; SHAPIRO *et al.*, 2007).

Insgesamt lieferten die meisten Marker in den hier untersuchten Spezies Ratte und Pferd vergleichbare Ergebnisse, was dafür spricht, dass die entsprechenden Proteine in diesen Spezies vergleichbar exprimiert werden. Die Beobachtungen aus der vorliegenden Studie korrelieren größtenteils mit den Daten aus der Literatur. Diskrepanzen waren vermutlich durch Unterschiede im Alter der untersuchten Tiere oder in der Aufarbeitung der Gewebeproben für die Histologie bedingt. Lediglich beim Marker NeuN schien ein tierartspezifischer Unterschied vorzuliegen. Berichte über die Verwendung von NeuN im olfaktorischen Epithel des Pferdes existieren jedoch bislang nicht.

Insgesamt konnte gezeigt werden, dass das olfaktorische Epithel des Pferdes weitestgehend in seiner Struktur anderen Spezies entspricht. Unterschiede sind vor allem im detaillierten Vergleich der Typen des olfaktorischen Epithels zu finden. Hinsichtlich des Expressionsprofils kann gesagt werden, dass sich die meisten Proteine, die bei Nagetieren, Hunden oder Menschen nachgewiesen werden, auch beim Pferd nachweisbar sind. Um abschließend aufzuklären, ob die aufgedeckten Diskrepanzen tatsächlich durch Alter oder methodische Unterschiede bedingt sind, sollten weitere Studien mit Tieren verschiedener Altersklassen und weiterführenden Methoden durchgeführt werden. Zur Bestätigung der Proteinexpression wäre der Western Blot oder die Proteomik als umfassende Methode geeignet.

5.2 INITIALE PHASE DER INFEKTION NACH INTRANASALER BDV-INFEKTION VON LEWIS-RATTEN

5.2.1 Klinik und Histopathologie

Während des gesamten Untersuchungszeitraums von 3 Stunden bis 21 Tage nach der Infektion konnten keine klinischen Veränderungen beobachtet werden, die typisch für eine Infektion mit dem BDV gewesen wären.

In anderen Studien, in denen immunkompetente Ratten intranasal infiziert wurden, traten die ersten klinischen Symptome im Zeitraum von 18 bis 24 Tagen nach der BDV-Infektion auf (CARBONE *et al.*, 1987; MORALES *et al.*, 1988). Zu erwarten gewesen wären Inkoordination, Apathie und eine reduzierte Futteraufnahme mit Abmagerung. In 90 % der Fälle führte dies in vorherigen Studien zum Tod der Tiere innerhalb einer Woche nach Auftreten der Symptome (MORALES *et al.*, 1988). In Arbeiten anderer Arbeitsgruppen (CARBONE *et al.*, 1987; SHANKAR *et al.*, 1992; SAUDER und STAEHELI, 2003) wurde diese Symptomatik nicht vom typischen biphasischen Krankheitsverlauf abgegrenzt, der nach der intrazerebralen Infektion adulter Ratten auftrat (HERDEN *et al.*, 2000; WERNER-KEIŠŠ *et al.*, 2008). Jedoch fanden sich bei CARBONE *et al.* (CARBONE *et al.*, 1987) plötzlich auftretende Todesfälle der Tiere, wobei der Veröffentlichung nicht zu entnehmen ist, welchem Infektionsweg diese Tiere zuzuordnen sind. Auch in der Arbeit von Shankar *et al.* (SHANKAR *et al.*, 1992), in der die Tiere intranasal infiziert wurden, wird von einigen Tieren berichtet, die deutlich schwerere Symptome wie Krämpfe und Tremor zeigten und daraufhin euthanasiert wurden. In der Studie von Sauder *et al.* (SAUDER und STAEHELI, 2003), in der die Übertragbarkeit des BDV über Urin auf dem intranasalen Infektionsweg untersucht wurde, wurden nur die Symptome Apathie, gesträubtes Fell und blutige Nasen beschrieben. Da das Einsetzen der klinischen Symptome nach intranasaler Infektion um 21 Tage p.i. zu erwarten gewesen wäre, wurden die Tiere der eigenen Studie in diesem Zeitraum besonders eingehend untersucht und engmaschig kontrolliert. Möglicherweise wären klinische Symptome zu späteren Zeitpunkten aufgetreten. Eine Verschiebung des Auftretens klinischer Symptome kann von der Infektionsdosis, vom Alter, vom genetischen Hintergrund der Tiere, von der Viruspräparation und nicht zuletzt von der Infektionsroute abhängen (NARAYAN *et al.*, 1983a, b; HERZOG *et al.*, 1984; CARBONE *et al.*, 1987; MORALES *et al.*, 1988; HERZOG *et al.*, 1991; SHANKAR *et al.*, 1992; HERDEN *et al.*, 2000; SAUDER und STAEHELI, 2003; WERNER-KEIŠŠ *et al.*, 2008). Darüber hinaus kann selbst unter sonst gleichen experimentellen Bedingungen stets eine gewisse Variabilität im Infektionsverlauf gesehen werden (NARAYAN *et al.*, 1983a, b; CARBONE *et al.*, 1987; MORALES *et al.*, 1988; HERDEN *et al.*, 2000; WERNER-KEIŠŠ *et al.*, 2008).

Histopathologische Veränderungen des ZNS sind üblicherweise kurz vor dem Auftreten erster klinischer Symptome zu finden (NARAYAN *et al.*, 1983a, b; MORALES *et al.*, 1988; HERDEN *et al.*, 2000; HERDEN *et al.*, 2005; WERNER-KEIŠŠ *et al.*, 2008; HERDEN *et al.*, 2013) und sind durch eine Meningoenzephalitis mit perivaskulären und parenchymatösen mononukleären Entzündungszellinfiltrationen gekennzeichnet (NARAYAN *et al.*, 1983a, b; MORALES *et al.*, 1988; HERDEN *et al.*, 2000; HERDEN *et al.*, 2005; WERNER-KEIŠŠ *et al.*, 2008; HERDEN *et al.*, 2013). In der Studie von Morales *et al.* (MORALES *et al.*, 1988) waren nach intranasaler Infektion erste entzündliche Veränderungen im ZNS 18 dpi zu finden, erste klinische Symptome traten 24 dpi auf. In einigen Tieren ließen sich histologische Veränderungen jedoch erst 27 Tage nach intranasaler BDV-Infektion nachweisen (MORALES *et al.*, 1988). Eine Meningoenzephalitis trat bei den untersuchten Ratten der vorliegenden Studie bis 21 dpi nicht auf. Auch die beschriebenen Nekroseherde oder ödematisierten Bereiche in der grauen Substanz (MORALES *et al.*, 1988) waren nicht auffindbar. Im Bereich der Nase konnten bei keiner der Ratten zu keinem Untersuchungszeitpunkt morphologische Veränderungen oder Entzündungen beobachtet werden. Dies entspricht den Beobachtungen aus anderen Studien (CARBONE *et al.*, 1987; MORALES *et al.*, 1988; SHANKAR *et al.*, 1992).

5.2.2 Nachweis von BDV-N

Bislang lagen nur wenige Informationen über die Initialphase der intranasalen BDV-Infektion vor (MORALES *et al.*, 1988). In vielen Studien, die sich mit dieser Infektionsroute beschäftigten, von welcher angenommen wird, dass sie der natürlichen Infektion entspricht, beginnen die weiterführenden pathologischen und virologischen Untersuchungen erst bei Beginn der klinischen Symptome. Diese Studien stehen häufig in Zusammenhang mit Fragestellungen zur Virusausbreitung im Tier (CARBONE *et al.*, 1987) oder beschränkten sich hauptsächlich auf den Nachweis viraler RNA im Gehirn (SHANKAR *et al.*, 1992).

In der vorliegenden Studie wurde im olfaktorischen Epithel erstmalig 4 Tage nach der Infektion BDV-Nukleoprotein nachgewiesen. Dies war in einzelnen adulten Neuronen in 2 der 5 untersuchten Ratten der Fall. Dies ist 2 Tage früher als in der von Morales *et al.* (MORALES *et al.*, 1988) publizierten Studie, wo virales Antigen nach 6 Tagen im Nukleus und im Zytoplasma von einzelnen als *olfactory receptor cells* bezeichneten Zellen beobachtet wurde. Eine Unterscheidung in reife und unreife Neurone bzw. in deren Vorläufer wurde nicht vorgenommen. In der vorliegenden Studie wurden die verschiedenen Zellen des olfaktorischen Epithels gesondert betrachtet, um mehr Erkenntnisse zu der initialen Phase der Infektion zu gewinnen. Anhand der initial infizierten Zellen lassen sich möglicherweise Hinweise auf einen Rezeptor für das BDV erlangen. Außerdem trägt die genauere

Untersuchung der Zelltypen des Epithels dazu bei, den Ausbreitungsmechanismus des BDV zu verstehen und eine Antwort auf die Frage zu finden, ob und in welchen Zellen eine Virusreplikation vor der Ausbreitung ins ZNS stattfindet. In der Studie von Morales *et al.* fanden sich bis 20 dpi stets nur wenige positive Zellen im olfaktorischen Epithel. 22 dpi war BDV-N nicht mehr in olfaktorischen Neuronen zu finden, jedoch bis 27 dpi in einzelnen Nervenfasern des intranasalen Anteils des Riechnervs vorhanden. Dies steht im Gegensatz zu den Ergebnissen dieser Studie. 4 dpi war BDV-N nicht nur in reifen Riechnervenzellen sichtbar, sondern bei einer Ratte auch in einzelnen unreifen Nervenzellen. 7 Tage p.i. war in der vorliegenden Studie auch erstmalig Virusantigen in den proliferierenden Basalzellen zu finden. Zum Zeitpunkt 14 dpi war eine deutliche Steigerung in der Zahl BDV-N-positiver Zellen in allen 5 untersuchten Tieren zu beobachten. Gleichzeitig konnte zu diesem Zeitpunkt in den Ratten eine deutliche Zunahme BDV-N-positiver juveniler Neurone verzeichnet werden. In einem Teil der Ratten war BDV-N ebenfalls in den proliferierenden und horizontalen Basalzellen sowie in den Stützzellen detektierbar. Auch in den Nervenfasern der Submukosa und in den olfaktorischen Hüllzellen wurde 14 dpi in allen 5 Tieren virales Antigen nachgewiesen. Eine weitere Zunahme BDV-N-positiver Zellen wurde 21 dpi in allen untersuchten Kompartimenten beobachtet. Im Laufe der Zeit konnte BDV-N in den reifen und unreifen olfaktorischen Neuronen, in den proliferierenden und horizontalen Basalzellen, in den Stützzellen sowie in den Nervenfasern und den olfaktorischen Hüllzellen detektiert werden. Dass die Zunahme BDV-N-positiver Zellen mit der Infektionsdauer signifikant war, konnte mittels des exaktem Kruskal-Wallis-Tests bestätigt werden. Außerdem konnte mit dem Rangkorrelationskoeffizient nach Spearman belegt werden, dass hier ein deutlicher Zusammenhang zwischen Zeit nach der Infektion und der Zahl positiver Zellen vorhanden war und dass es sich bei dieser Zunahme um einen monotonen Trend handelte. Das bedeutet, dass im Laufe der Zeit immer mehr BDV-N nachweisbar war und dass sich diese Tendenz nicht umkehrte. Es kann nicht beurteilt werden, ob in der Arbeit von Morales *et al.* (MORALES *et al.*, 1988) nur auf die reifen Riechnervenzellen geachtet wurde oder ob tatsächlich kein Antigen in den anderen Zelltypen vorhanden war.

Um den weiteren Verlauf der Infektion zu verfolgen und mit den Ergebnissen aus vorangegangenen Studien zu vergleichen, wurde zusätzlich das Gehirn der Tiere untersucht. Dort war erstmalig 14 Tage nach der Infektion BDV-N nachweisbar. Dies entspricht dem Zeitpunkt, bei dem erstmalig auch die olfaktorischen Hüllzellen ein positives Signal aufweisen. Ihnen wird eine wichtige Funktion bei der Virusausbreitung zugesprochen, da *in vitro* gezeigt wurde, dass sie die Replikation vom Humanen Herpesvirus 6 fördern können (HARBERTS *et al.*, 2011). In der Studie von Morales *et al.* war BDV-N hingegen bereits 8 dpi in den Nervenfasern und in den periglomerulären Zellen des Bulbus olfactorius nachweisbar.

Auffallend waren insgesamt folglich die Unterschiede bezüglich des ersten Antigen-Nachweises und des erstmaligen Auftretens von klinischen Symptomen sowie der entzündlichen Veränderungen im ZNS. Auch die Zahl der positiven Zellen im olfaktorischen Epithel im Laufe der Infektion war deutlich höher als bei Morales *et al.* beschrieben. Es ist nicht auszuschließen, dass dies unter anderem mit der abweichenden Infektionsdosis bzw. dem Titer der Virussuspension zusammenhängt. Wie bei Morales *et al.* wurden vier Wochen alte Lewis-Ratten verwendet. Jedoch ergeben sich häufig relevante Unterschiede bei den Tierlinien verschiedener Lieferanten hinsichtlich der Empfänglichkeit für Infektionen. Nicht zuletzt spielen auch die Haltung der Tiere und der allgemeine Gesundheitsstatus eine entscheidende Rolle für den Verlauf der BDV-Infektion. Da die vorliegende Studie mehr als 20 Jahr später als die Studie von Morales *et al.* durchgeführt wurde, ist davon auszugehen, dass sich die Versuche in diesen Punkten deutlich unterschieden haben.

5.2.3 Nachweis von viraler genomischer RNA und BDV-N mRNA

Bislang wurde lediglich BDV-N nach intranasaler Infektion in der Riechschleimhaut nachgewiesen (MORALES *et al.*, 1988). Nachweise genomischer RNA und mRNA als Hinweis auf eine effektive Transkription und Replikation im olfaktorischen Epithel waren nicht vorhanden. Positiv- und negativsträngige BDV-RNA wurde lediglich in einer Kinetik nach intranasaler Infektion adulter Ratten im Bulbus olfactorius mittels RT-PCR nachgewiesen (SHANKAR *et al.*, 1992). Dort war sie erstmals 6 Tage nach der intranasalen Infektion nachweisbar, 14 Tage nach der Infektion war dies in allen untersuchten Gehirnregionen der Fall. Erst zu dem späten Zeitpunkt 26 dpi wurde auch Gesamt-BDV-RNA in der Nasenschleimhaut nachgewiesen (SHANKAR *et al.*, 1992), wobei unklar bleibt, ob es sich tatsächlich um die Riechschleimhaut oder auch um respiratorisches Epithel gehandelt hat. In der vorliegenden Studie konnte jedoch zu keinem Zeitpunkt virales Protein oder virale RNA im respiratorischen Epithel detektiert werden. Weiterhin lässt sich der Veröffentlichung nicht entnehmen, ob zu früheren Zeitpunkten tatsächlich keine RNA im Gewebe vorhanden war oder ob dies nicht untersucht wurde. Genomische und antigenomische RNA lag in gleichen Verhältnissen vor, was durch eine RT-PCR mit spezifischen Primern für die jeweilige RNA exemplarisch an isolierter RNA aus dem Gehirn anhand der Bandenstärke gezeigt wurde (SHANKAR *et al.*, 1992).

Aus diesem Grund war es von großem Interesse, wie der Nachweis genomischer RNA und mRNA mit dem Nachweis von BDV-N korreliert. Dies sollte zur Klärung der Frage beitragen, ob und wann eine virale Replikation und Transkription des Virus im olfaktorischen Epithel stattfindet oder ob die Virusvermehrung primär im Gehirn abläuft.

Die BDV-RNA aus dem Bereich des BDV-N-Gens war in der *In-situ*-Hybridisierung erstmalig 7 Tage nach der Infektion in einem Teil der Ratten in adulten und juvenilen Neuronen zu finden. Auch in den Nervenfasern und bei einem Tier zusätzlich in den OECs konnte zu diesem Zeitpunkt (7 dpi) genomische RNA detektiert werden. 14 dpi war in allen untersuchten Ratten genomische RNA in den reifen und unreifen Riechnervenzellen sowie in den OECs vorhanden, in den Nervenfasern jedoch nur bei 2 Ratten. Insgesamt konnte, außer für die Nervenfasern, eine Steigerung der Anzahl positiver Zelle detektiert werden. In beiden Ratten, die 21 Tage p.i. untersucht wurden, war in den reifen und unreifen Neuronen sowie in den Nervenfasern virale genomische RNA zu finden. Auch bei diesem Untersuchungszeitpunkt konnte eine deutlich Zunahme der positiven Zellen bzw. auch der Nervenfasern beobachtet werden. Zu keinem Zeitpunkt war genomische RNA in Stützzellen oder Basalzellen zu finden. Dass im Laufe der Infektion mehr positive Zellen zu finden waren und dass dies signifikant für die Zelltypen war, in denen der Nachweis gelang, konnte mit dem exakten Kruskal-Wallis-Test belegt werden. Außerdem konnte mit dem Rangkorrelationskoeffizient nach Spearman gezeigt werden, dass die Zahl positiver Zellen, bezogen auf die Zelltypen, in denen der Nachweis im Laufe der Zeit gelang und die Zeit nach der Infektion einen deutlichen Zusammenhang aufwiesen und einem monotonen Trend folgen. Im Laufe der Zeit nahm die Zahl positiver Zellen demnach stetig zu.

Im Gegensatz zu der genomischen RNA konnte in der vorliegenden Studie die für das BDV-N-codierende mRNA bereits 4 Tage p.i. im Riechepithel, und damit früher als die genomische RNA in den reifen Neuronen detektiert werden. 7 Tage nach der Infektion konnte eine Zunahme positiver Zellen gesehen werden. In anderen Zelltypen, darunter juvenile Neurone und olfaktorische Hüllzellen, sowie in Nervenfasern, war BDV-N mRNA erst 14 dpi sichtbar. Auffallend war dabei, dass auch keine mRNA in den Stützzellen, sowie in den horizontalen und proliferierenden Basalzellen zu finden war. Wie auch bei der genomischen RNA, konnte mit dem exakten Kruskal-Wallis-Test berechnet werden, dass die Zunahme der positiven Zellen im Laufe der Zeit signifikant war. Auch hier konnte ein deutlicher Zusammenhang zwischen Zeit nach der Infektion und Anzahl positiver Zellen gesehen werden. Ein monotoner Trend bzw. eine stete Zunahme der positiven Zellen wurde mit dem Rangkorrelationskoeffizient nach Spearman bestätigt. Beide statistischen Untersuchungen waren nur für die Zellen in denen die mRNA im Laufe der Zeit nachgewiesen wurde, durchführbar.

Diese Ergebnisse sind gegensätzlich zu denen aus der Studie von Shankar *et al.* (SHANKAR *et al.*, 1992). Während dort berichtet wurde, dass in der Nasenschleimhaut BDV-N-RNA erst 26 Tage nach der Infektion nachgewiesen werden konnte, war in der vorliegenden Studie BDV-N mRNA im olfaktorischen Epithel bereits 4 dpi zu finden. Während Shankar *et al.* eine konventionelle RT-PCR nutzten, wurde in der vorliegenden

Studie eine *In-situ*-Hybridisierung angewendet. Während bei einer PCR die gesuchten Genomsequenzen vervielfältigt werden, werden bei der *In-situ*-Hybridisierung hingegen lediglich die Kopien genomischer RNA und mRNA nachgewiesen. So sollte mittels RT-PCR virale RNA bereits früh nachzuweisen sein, was in der vorliegenden Arbeit bestätigt wurde. Es ist letztlich jedoch nicht auszuschließen, dass die Nasenschleimhaut in der Studie von Shankar *et al.* zu früheren Zeitpunkten gar nicht untersucht wurde. Shankar *et al.* stellten ein ausgewogenes Verhältnis von genomischer und antigenomischer RNA fest. Diese Untersuchung wurde jedoch nur exemplarisch für die Gesamt-RNA des Gehirns durchgeführt, wobei aus der Veröffentlichung nicht ersichtlich ist, zu welchem Zeitpunkt p.i. die Untersuchung stattfand. Eine Auswertung der Infektionskinetik mittels quantitativer *real time* RT-PCR erscheint sinnvoll, um ein umfassendes Bild der viralen Transkription und Replikation zu erhalten.

5.2.4 Korrelation des Nachweises von BDV-N, korrespondierender mRNA und genomischer RNA

In der vorliegenden Arbeit wurde das olfaktorische Epithel nach intranasaler BDV-Infektion auf Vorhandensein von BDV-N bzw. der entsprechenden genomischen und mRNA untersucht. Es konnte nachgewiesen werden, dass es im Verlauf der Infektion zu einer Zunahme der infizierten Zellen im olfaktorischen Epithel kam. Sowohl bei dem viralen Antigen als auch bei beiden nachgewiesenen RNAs konnte ein deutlicher Zusammenhang zwischen Zeit nach der Infektion und Zahl positiver Zellen bzw. Nervenfasern mit einem monotonen, zunehmenden Trend bestimmt werden. Folglich fand im olfaktorischen Epithel der Ratten eine virale Replikation und Transkription sowie die Translation statt. Dies steht, zumindest für das virale Antigen, im Gegensatz zu den bisher bekannten Ergebnissen (MORALES *et al.*, 1988). Für die virale RNA und die entsprechende mRNA lagen bislang keine Erkenntnisse aus vorangegangenen Studien vor.

Hinweise auf die Infektion ergaben sich in der vorliegenden Studie erstmalig 4 dpi durch den Nachweis von BDV-N in adulten und juvenilen olfaktorischen Neuronen. Gleichzeitig war auch mRNA erstmalig in adulten Neuronen zu detektieren. 7 dpi wurde BDV-N erstmals auch in proliferierenden Basalzellen nachgewiesen. Zu diesem Zeitpunkt war genomische RNA in adulten und juvenilen Neuronen sowie in Nervenfasern und in olfaktorischen Hüllzellen zu finden. BDV-N mRNA war erst 14 dpi auch in juvenilen Neuronen, olfaktorischen Hüllzellen und Nervenfasern detektierbar. Zu den Zeitpunkten 14 und 21 dpi wiesen alle untersuchten Zellen, darunter adulte und juvenile Neurone, proliferierende und horizontale Basalzellen, Stützzellen, olfaktorische Hüllzellen, sowie die Nervenfasern BDV-N auf. Sowohl die BDV-N mRNA als auch die genomische RNA war während des gesamten Untersuchungszeitraums

nur in adulten und juvenilen Neuronen sowie in Nervenfasern und olfaktorischen Hüllzellen zu finden.

4 Tage nach der Infektion war gleichzeitig BDV-N und BDV-N mRNA in reifen olfaktorischen Neuronen nachweisbar. Dies spricht dafür, dass zu diesem Zeitpunkt bereits Transkription stattgefunden hat und BDV synthetisiert wurde. Es ist bekannt, dass das Nukleoprotein entsprechend des 3' zu 5'-Transkriptiongradienten, der typisch für Viren der Ordnung *Mononegavirales* ist, am meisten produziert wird (PYPER und GARTNER, 1997; DE LA TORRE, 2002; TOMONAGA *et al.*, 2002). Auch in einigen wenigen unreifen Neuronen war zu diesem Zeitpunkt bereits BDV-N detektierbar. Dies weist darauf hin, dass auch dieser Zelltyp infizierbar ist, auch wenn die juvenilen Neurone erst im Laufe der Reifung mit ihrem Dendriten die Epitheloberfläche erreichen und Zilien auf den dendritischen Knöpfen ausbilden (CHUAH *et al.*, 1985). Dass die juvenilen Neurone zu einem so frühen Zeitpunkt infiziert waren, kann ein Hinweis auf eine bereits erfolgte Ausbreitung des Virus von Zelle zu Zelle sein. Dies gilt auch für die proliferierenden Basalzellen, die 7 dpi erstmals BDV-N aufwiesen und im intakten OE keinen Kontakt zu der Epitheloberfläche haben. Allerdings gelang in diesen Zellen nie der Nachweis genomischer RNA oder BDV-N mRNA. Es ist nicht auszuschließen, dass die virale RNA hier unter der Nachweisgrenze liegt und in diesen Zellen vornehmlich Translation stattfindet oder diese Zellen das virale Protein nur aufnehmen. Es ist bekannt, dass eine Imbalance in der Proteinmenge oder eine Überexpression der Bestandteile des Nukleokapsids vor einer Superinfektion oder einer Infektion mit ähnlichen Viren schützt (GEIB *et al.*, 2003). Möglicherweise spielt dieser Mechanismus in den entsprechenden Zellen eine Rolle und verhindert so eine effiziente Replikation. Unklar ist weiterhin, ob die verschiedenen Zelltypen Unterschiede in der Expression der endogenen Sequenzen aufweisen. So wurde gezeigt, dass diese Sequenzen beim Dreizehnstreifen-Hörnchen *in vitro* als Proteine exprimiert werden können, die eine Interaktion mit dem Ribonukleoprotein des BDV ermöglichen. Dies könnte in einer Inhibition der BDV-Infektion resultieren (FUJINO *et al.*, 2014). Um dies umfassend aufzuklären und um ein negatives Ergebnis aufgrund einer zu hohen Nachweisgrenze auszuschließen, wäre die Untersuchung mittels *Laser Microdissection and Pressure Catapulting* (LMPC) hilfreich. So könnten die entsprechenden Zellen isoliert und in einer *real time* RT-PCR auf genomische und antigenomische BDV-RNA untersucht werden.

Genomische RNA konnte erst 7 Tage nach der Infektion detektiert werden. Gleichzeitig konnte genomische RNA bereits zu diesem Zeitpunkt in Nervenfasern der Lamina propria und in den olfaktorischen Hüllzellen gesehen werden. Dies spricht ebenfalls dafür, dass die Infektion sich erfolgreich in Richtung des ZNS ausgebreitet hat. BDV-N oder BDV-N mRNA waren zu diesem Zeitpunkt noch nicht in diesen Strukturen nachweisbar, sondern nur in den Neuronen, was dafür sprechen kann, dass nicht Transkription und Translation, sondern

lediglich Virusreplikation stattgefunden hat und virale genomische RNA in Richtung Gehirn transportiert wird.

Der Zeitpunkt des erstmaligen Nachweises von BDV-N und korrespondierender mRNA in Nervenfasern und in den OECs (14 dpi) korrelierte mit dem ersten Auftreten von BDV-N im Gehirn. Dies kann ein Zeichen dafür sein, dass die OECs, die die Nervenfasern umhüllen, wichtig für eine effiziente Ausbreitung sind. Von Harberts *et al.* (HARBERTS *et al.*, 2011) wurde dies bereits für das humane Herpesvirus 6 gezeigt, da sie die Replikation *in vitro* fördern. Sie werden im Infektionsverlauf früh infiziert, worauf der Nachweis der genomischen RNA bereits 7 dpi in der vorliegenden Studie hinweist. Eine Möglichkeit der Diffusion von Viren ins Gehirn über von olfaktorischen Hüllzellen gebildete Kanäle wurde von van Riel *et al.* (VAN RIEL *et al.*, 2015) diskutiert. Für das BDV mit seiner geringen Größe wäre dies prinzipiell denkbar, allerdings konnte diese Art der Ausbreitung noch nicht abschließend bewiesen werden und scheint vornehmlich beim Transport von Substanzen ins ZNS eine Rolle zu spielen (OBERDORSTER *et al.*, 2004; DHURIA *et al.*, 2010; GIZURARSON, 2012). Die in dieser Studie erhobenen Daten lassen die Schlussfolgerung zu, dass die Zellen neuronalen und glialen Ursprungs eine wichtige Rolle für die Replikation und Transkription des BDV im olfaktorischen Epithel spielen. Nur in den adulten und juvenilen olfaktorischen Neuronen, in den Nervenfasern und den gliaartigen olfaktorischen Hüllzellen (BABIARZ *et al.*, 2011) wurde genomische RNA und BDV-N mRNA gefunden. Auch in den kugelförmigen Basalzellen, die als Vorläufer der Riechnervenzellen gelten, konnte kein Virusgenom und keine BDV-N mRNA nachgewiesen werden. Es ist jedoch nicht auszuschließen, dass eine Infektion der anderen Zellen möglich ist und dass die Menge der viralen RNA nur unter dem Detektionsniveau der *In-situ*-Hybridisierung lag. Hierfür spricht auch, dass virales Antigen in allen untersuchten Zelltypen zu finden war. Nicht auszuschließen ist auch eine Aufnahme von viralen Proteinen durch die Zelltypen, in denen BDV-N, jedoch keine BDV-RNA nachweisbar war.

Insgesamt spricht der Nachweis von BDV-N, korrespondierender mRNA und genomischer RNA dafür, dass eine initiale Virusvermehrung bereits im olfaktorischen Epithel stattfindet. Weiterhin war sowohl für BDV-N als auch für genomische und BDV-N mRNA ein deutlicher Anstieg positiver Zellen über die Zeit zu erkennen, sodass die Virusvermehrung über die Zeit anzusteigen scheint. Am deutlichsten wurde dies bei der BDV-N mRNA, die am frühesten nachweisbar war und bei der ein deutlicher Anstieg zu verzeichnen war, bevor das Virus im Gehirn zu finden war. Folglich dominiert zunächst die Transkription bevor es zur effizienten Replikation des Virus kommt. Der Virusvermehrung im olfaktorischen Epithel dürfte folglich auch eine wichtige Rolle bei der Virusausscheidung über Nasensekrete zukommen.

Die initiale Infektion von einigen wenigen Zellen reicht demnach aus, um eine erfolgreiche Virusausbreitung ins Gehirn sicher zu stellen, da eine effiziente Replikation und Transkription

des BDV im olfaktorischen Epithel stattfindet. Wie dies erfolgt, sollte in weiteren Studien geklärt werden, die auch die Expression des für die Zell-zu-Zellausbreitung notwendige virale Glykoprotein mit einbeziehen (LENNARTZ *et al.*, 2015).

5.2.5 Proliferation des olfaktorischen Epithels

Es wurde untersucht, ob die BDV-Infektion zu einer Änderung in der Proliferationsrate der Zellen des olfaktorischen Epithels führt. Es sollten so indirekt Hinweise darüber erlangt werden, ob es zu einer vermehrten Abschilferung der Zellen und zum Versuch der Viruseliminierung kommt. Das olfaktorische Epithel besitzt die Fähigkeit zur lebenslangen Regeneration, die von den Basalzellen ausgeht (GRAZIADEI und GRAZIADEI, 1979; FARBMAN und MARGOLIS, 1980; GRAZIADEI und MONTI GRAZIADEI, 1983). Die adulten olfaktorischen Neurone haben direkten Kontakt zur Umwelt und sind so den verschiedensten Noxen, darunter auch Infektionen, ausgesetzt (FARBMAN, 1990). Eine Reaktion auf eine exogene Noxe, die in einer vermehrten Zellproliferation mündet, wurde für Schäden wie die Neurektomie (CAMARA und HARDING, 1984) oder nach experimenteller Exposition von schädlichen Substanzen (MILLER *et al.*, 2003; OGAWA *et al.*, 2014) bereits gezeigt und ist demnach auch für Virusinfektionen denkbar. Proliferierende Zellen wurden in der Immunhistologie mit dem Marker PCNA (*Proliferating cell nuclear antigen*) nachgewiesen. Dabei wurden die BDV-infizierten mit den Mock-infizierten Tieren verglichen.

Mit den Daten der vorliegenden Studie waren keine signifikante Unterschiede in der Proliferation des olfaktorischen Epithels bzw. in der Zahl der PCNA-positiven Zellen zu finden. Weder im Laufe der Zeit nach der Infektion noch zwischen den Gruppen BDV- und Mock-infiziert konnten deutliche Unterschiede in der Proliferation gefunden werden, die als Reaktion auf die BDV-Infektion hätte interpretiert werden können.

5.3 DISSOZIATIONSKULTUR DES OLFAKTORISCHEN EPITHEL

5.3.1 Charakterisierung der Dissoziationskultur

In der vorliegenden Studie war es oberste Prämisse, ein Zellkultursystem zu entwickeln, dass möglichst nah am Tiermodell, der intranasalen Infektion immunkompetenter Lewis-Ratten ist (CARBONE *et al.*, 1987; MORALES *et al.*, 1988), um eine optimale Vergleichbarkeit mit der natürlichen Infektion und eine Reduktion der Anzahl der für einen Tierversuch benötigten Tiere nach dem 3R-Prinzip von Russell und Burch (RUSSELL und BURCH, 1959) zu ermöglichen.

Kulturen aus dem Riechepithel der Ratte wurden bislang meist aus neugeborenen Ratten gewonnen (PIXLEY und PUN, 1990; RONNETT *et al.*, 1991; PIXLEY, 1992, 1996) und

häufig wurden Differenzierungsvorgänge der Vorläuferzellen untersucht (FERON *et al.*, 1999; WETZIG *et al.*, 2011). Auch auf die Verwendung von sogenannten *feeder layers* wurde verzichtet. Diese bestehen meist aus einer Schicht Astrozyten bzw. Gliazellen des Cortex cerebri, auf die die eigentlichen olfaktorischen Neurone aufgetragen werden. Sie sollen ein längeres Überleben und eine bessere Ausdifferenzierung der Neurone begünstigen (PIXLEY, 1992, 1996; GRILL und PIXLEY, 1997; CHEN *et al.*, 2008). Es ist jedoch bekannt, dass Gliazellen *in vivo* und auch *in vitro* gut mit dem BDV infizierbar sind (RICHT und STITZ, 1992; CARBONE *et al.*, 1993; HERDEN *et al.*, 2000; WERNER-KEIŠŠ *et al.*, 2008; KEHR, 2015, eingereicht). Aus diesem Grund musste eine neue Präparationsmethode etabliert werden, die sich an bereits veröffentlichten Protokollen orientierte (GRILL und PIXLEY, 1997; VARGAS und LUCERO, 1999b, a; BRAUCHI *et al.*, 2006). Aufgrund des fehlenden *feeder layers* wurden die Deckgläschen für die Kultur mit Poly-L-Lysin beschichtet, um eine bessere Anheftung der primären Zellen zu ermöglichen. In Vorversuchen wurde das am besten geeignete Beschichtungsmedium ermittelt. Andere Beschichtungen, wie beispielsweise Laminin, was explizit für Neuronenkulturen empfohlen wird, brachten keine Vorteile, wie auch bei Pixley *et al.* beschrieben (PIXLEY und PUN, 1990). Ohne einen *feeder layer* war eine deutliche Reduktion der Neurone über die Zeit zu finden, was bisherigen Berichten entsprach (VARGAS und LUCERO, 1999b, a). An Tag 7 nach der Präparation waren meist keine Neurone mehr detektierbar (PIXLEY, 1992; GRILL und PIXLEY, 1997). Über den Anteil der olfaktorischen Neurone an der gesamten Zellpopulation zur Zeit der Aussaat und im Verlauf der Zeit gibt es nur wenige genaue Angaben. In der Studie von Grill *et al.* (GRILL und PIXLEY, 1997) wurden zwar die Zahlen der ausgesäten Zellen und die Zahl der Neurone, die positiv für OMP waren genannt, jedoch ist unklar welcher Anteil der ausgesäten Zellen sich tatsächlich angeheftet hat. Um dieses Problem zu vermeiden, wurden in der vorliegenden Studie zunächst eine definierte Zahl an Zellen auf den Deckgläschen ausgezählt und danach der Anteil der Neurone bestimmt. Initial bzw. 4 Stunden nach der Aussaat waren durchschnittlich 33 % der Zellen Neurone. Ein höherer Anteil der Neurone an der Gesamtzellzahl konnte in der Studie von Brauchi *et al.* erhalten werden (BRAUCHI *et al.*, 2006). Hier ist die Rede von 77 % nach 48 Stunden in Kultur, wobei sich die Präparationsmethode und die Kulturbedingungen von denen der vorliegenden Studie deutlich unterscheiden.

Die Morphologie der Zellen in der eigenen Studie entsprach der bereits beschriebenen Morphologie von Kulturen des olfaktorische Epithel. Auch die Anfärbung der Neurone mit β III-Tubulin in der indirekten Immunfluoreszenz entsprach dem Bild anderer Arbeitsgruppen (CHEN *et al.*, 2008). Hinsichtlich der OMP-Expression fanden sich widersprüchliche Angaben. Während bei einigen Arbeitsgruppen der Nachweis im kultivierten olfaktorischen Epithel gelang (GRILL und PIXLEY, 1997; VARGAS und LUCERO, 1999b; BRAUCHI *et al.*,

2006), konnten andere kein OMP in diesem nachweisen (PIXLEY und PUN, 1990). Als Ursache wurde ein Fehlen trophischer Faktoren vermutet oder diskutiert, dass es sich in den Fällen in denen die Anfärbung gelang, um ein Artefakt handeln könnte (PIXLEY, 1992). *In vivo* ist beschrieben, dass sich OMP bei der Maus erst dann nachweisen lässt, wenn es eine synaptische Verbindung zum Bulbus olfactorius gibt (GRAZIADEI *et al.*, 1980). Ob dies *in vitro*, also bei Verlust dieses Kontaktes, die Reduktion der OMP-Expression verursacht, ist denkbar. Bei eigenen Vorversuchen wurden zwei verschiedene Antikörper gegen OMP getestet und als nicht zuverlässig bewertet, da nur äußerst selten eine extrem schwache Färbung in der Immunfluoreszenz zu detektieren war. In keiner der Studien, die sich mit der Etablierung des olfaktorischen Epithels befassen (PIXLEY und PUN, 1990; PIXLEY, 1992, 1996; GRILL und PIXLEY, 1997; VARGAS und LUCERO, 1999b, a; BRAUCHI *et al.*, 2006) wurde auf andere zellulären Komponenten, wie beispielsweise die OECs, eingegangen. Aus diesem Grund sind keine Vergleiche der prozentualen Anteile der olfaktorischen Hüllzellen an der Gesamtzellzahl möglich. Es kann allerdings gesagt werden, dass in den eigenen Studien der Gehalt der morphologisch als OECs identifizierten Zellen in der Kultur über die Zeit nur wenig Schwankungen zeigte. Ein Grund für das ausbleibende Überwuchern dieses Zelltyps kann in dem Kulturmedium gesehen werden. Da es sich hierbei um ein serumfreies Medium handelt, was den Neuronen zugute kommt, sind keine optimalen Kulturbedingungen für die Vermehrung der OECs und auch der Fibroblasten gegeben. Es ist allerdings zu beachten, dass dieser Zelltyp in der vorliegenden Studie nur anhand seiner Morphologie identifiziert wurde. Eine Doppelmarkierung wurde nicht durchgeführt. Die Auszählung der Hüllzellen auf Basis ihrer Morphologie sollte einer ersten Orientierung zur ungefähren Abschätzung des Anteils dieses Zelltyps an der Gesamtzellzahl dienen. Für gesicherte Angaben sollte erneut eine Kinetik der Dissoziationskultur des olfaktorischen Epithels mit Charakterisierung der kultivierten Zelltypen über die Zeit in Kultur erfolgen.

Insgesamt konnte in der etablierten Dissoziationskultur eine deutliche Reduktion der olfaktorischen Neurone im Laufe der Zeit beobachtet werden. Waren 4 Stunden nach der Aussaat noch rund 33 % der Zellen positiv für β III-Tubulin, so reduzierte sich der durchschnittliche Anteil auf rund 6 % nach 7 Tagen. *In vivo* hingegen dominieren die adulten olfaktorischen Neurone das Bild des Epithels. Dies spiegelt die Komplexität von neuronalen primären Zellkulturen wider. Eine Ausdifferenzierung der Vorläuferzellen war ohne die Zugabe von Wachstumsfaktoren nicht zu beobachten. Zu späteren Zeitpunkten als 7 DIV waren nur noch sporadisch einzelne β III-Tubulin-positive Zellen zu finden. Die verbleibenden Zellen konnten länger als 14 Tage unter den serumfreien Kulturbedingungen erhalten werden.

5.3.2 BDV-Infektion der Dissoziationskultur des olfaktorischen Epithels

4 Tage nach der BDV-Infektion konnte die Infektion mittels Nachweis von BDV-N bestätigt werden. Es zeigte sich das aus anderen Zelllinien, bei denen BDV-N detektiert wurde, bekannte Bild der intranukleären Granula (HERZOG und ROTT, 1980; KEHR, 2015, eingereicht). Daneben konnte in den meisten Zellen zusätzlich zu der granulären Kernfärbung auch eine diffuse Anfärbung des Zytoplasmas beobachtet werden. Dies spricht während der akuten Phase der Infektion für eine effiziente Translation. In der vorliegenden Studie fiel vor allem auf, dass nicht nur die olfaktorischen Neurone BDV-infiziert waren, sondern dass auch nicht-neuronale Komponenten des olfaktorischen Epithels und der Lamina propria, darunter auch Zellen, die in ihrer Morphologie olfaktorischen Hüllzellen und Fibroblasten entsprachen, infizierbar waren. Dies spiegelt ebenfalls die Situation nach intranasaler Infektion der Lewis-Ratten wider. Auch hier konnte BDV-N nicht nur in den Neuronen nachgewiesen werden, sondern beispielsweise auch in den Stützzellen und den olfaktorischen Hüllzellen (4.2.3.1). Dies zeigt, dass während der initialen Phase eine effiziente Ausbreitung auch in nicht-neuronalen Zellen stattfindet und dass zu diesem Zeitpunkt vermehrt Translation stattfindet. Dass auch nicht-neuronale Zellen *in vitro* mit BDV infiziert werden können, ist bekannt (HERZOG und ROTT, 1980; ESSBAUER *et al.*, 2011). So werden beispielsweise persistent infizierte MDCK-Zellen zur serologischen Diagnostik genutzt (HERZOG und ROTT, 1980).

In der vorliegenden Studie konnte eine deutliche Ausbreitung der Infektion in der Kultur über die Zeit festgestellt werden. Waren 4 dpi erst durchschnittlich rund 11 % der Zellen infiziert, so lag diese Quote 14 dpi bei durchschnittlich 29 %. Dieses Ergebnis spricht erneut dafür, dass nicht nur Neurone infiziert sein können, da zu den späten Untersuchungszeitpunkten nur noch wenige vorhanden waren. Infiziert waren zu diesem Zeitpunkt Zellen, die von ihrer Morphologie den olfaktorischen Hüllzellen und Fibroblasten entsprachen und folglich nicht-neuronalen Ursprungs waren. Jedoch waren auch viele Zellen BDV-N-positiv, die von ihrer Morphologie her nicht zugeordnet werden konnten. Es handelte sich hierbei wahrscheinlich um Vorläuferzellen oder Stützzellen, was in weiteren Studien geklärt werden sollte.

Mittels Doppelmarkierung der reifen olfaktorischen Neurone und BDV-N konnte gezeigt werden, dass die Neurone in der Kultur, zumindest zu den frühen Untersuchungszeitpunkten, wenn diese noch vorhanden waren, infizierbar sind.

Hinsichtlich der Eignung dieser Methode zur Reduktion bzw. als Ersatz für einen Tierversuch erscheint sie aufgrund der gewonnen Erkenntnisse durchaus geeignet, um bestimmte Fragestellungen zu beantworten. Insbesondere als Modell für Virusinfektionen, bei denen mit einer starken Belastung der Tiere zu rechnen ist, kann im Vorfeld aufgrund der

übereinstimmenden *In vitro*- und *In vivo*-Daten abgeschätzt werden, welche Zellen prinzipiell infizierbar sind. Dies ermöglicht eine Reduktion der zu verwendeten Tiere im Versuch.

5.4 ORGANOTYPISCHE GEWEBEKULTUR DES OLFAKTORISCHEN EPITHEL

5.4.1 Charakterisierung der organotypischen Gewebekultur

Bislang liegen nur wenige Beschreibungen über organotypische Gewebekulturen des olfaktorischen Epithels vor. Diese basieren meist auf einer Co-Kultivierung mit Gewebeanteilen des Bulbus olfactorius, um das Wachstum der Neurone und die Synapsenbildung zu beobachten (GONG *et al.*, 1996; KANAKI *et al.*, 2000; GOETZE *et al.*, 2002; MARKOPOULOS *et al.*, 2008). In der Mehrzahl der Studien werden allerdings nur Stücke des Bulbus olfactorius alleine kultiviert, um die verschiedensten Fragestellungen zu untersuchen (KANAKI *et al.*, 1997; IMBSCHWEILER *et al.*, 2012). Im Rahmen dieser Studie konnte eine Präparationsmethode für organotypische Kulturen des olfaktorischen Epithels etabliert werden. Auch nach 14 Tagen war noch vitales Gewebe auf der Membran zu finden. Problematisch war bei dieser Präparation allerdings die Tatsache, dass die Kulturen im Laufe der Zeit zerfielen bzw. sich Zellen aus dem Verband lösten und sich große Mengen Detritus neben den Gewebestückchen sammelte. Vermutlich handelte es sich hierbei auch um abgeschilferte Epithelien. Oft zeigte das olfaktorische Epithel bereits nach kurzer Zeit einen beginnenden Verlust der Struktur und es konnte auch keine Expression der Marker OMP und DCX nachgewiesen werden. Dies hängt vermutlich mit dem Verlust des Kontaktes zum Bulbus olfactorius zusammen, was mit den Beobachtungen aus der Dissoziationskultur des olfaktorischen Epithels in den eigenen Untersuchungen übereinstimmt. Hier gelang die Markierung der olfaktorischen Neurone mit OMP nur äußerst selten in einzelnen Zellen. Für die Maus ist bekannt, dass OMP im olfaktorischen Epithel nachweisbar ist, sobald die Nerven in Kontakt mit dem Riechkolben bekommen. Die vorliegenden Ergebnisse sprechen dafür, dass es bei Verlust dieser Synapse möglicherweise zum Abbau des Proteins kommt, welches an der Signaltransduktion des Riechens beteiligt ist. Zum Teil wiesen manche Gewebestücke präparationsbedingt respiratorisches Epithel mit gut erkennbaren Zilien auf, die zum Teil auch noch nach 2 Wochen in Kultur eine deutliche Flimmerbewegung zeigten. Bei diesem Epithel konnte im Vergleich zum olfaktorischen Epithel nur selten ein Strukturverlust beobachtet werden. Eine weitere Herausforderung stellte die für den histologischen Schnitt wichtige Ausrichtung des Gewebes aufgrund der geringen Probengröße dar. In weiteren Studien sollte zur Optimierung dieses Kultursystem die Co-Kultivierung mit Scheiben des Bulbus olfactorius getestet werden, was in einigen Studien

bereits durchgeführt wurde (KANAKI *et al.*, 2000; GOETZE *et al.*, 2002; MARKOPOULOS *et al.*, 2008).

5.4.2 BDV-Infektion der organotypischen Gewebekultur

Die BDV-Infektion konnte erstmals 4 dpi nachgewiesen werden. Es waren sowohl BDV-N als auch mRNA nachweisbar. Dieser Zeitpunkt entsprach ebenfalls dem ersten Nachweis in den intranasal infizierten Ratten, jedoch waren zuerst OECs infiziert, was daran liegen kann, dass diese frei zugänglich für das Virus vorlagen. Dies unterstreicht die gute Infizierbarkeit dieser Zellen und ihre Rolle im Rahmen von Virusinfektionen. Im Gegensatz zu der Situation im Tier war keine Ausbreitung der Infektion innerhalb des Epithels im zeitlichen Verlauf zu erkennen. Dadurch, dass das respiratorische Epithel lange Zeit in seiner Struktur in der Kultur stabil blieb, konnte einfach zwischen respiratorischem, welches im Tier und in den organotypischen Gewebekulturen nicht infiziert war, und olfaktorischem Epithel unterschieden werden, auch wenn keine OMP- oder DCX-positiven Zellen im Epithel nachweisbar waren. Es ist denkbar, dass für eine Ausbreitung im Gewebe Faktoren aus der Lamina propria bzw. die Verbindung zum Bulbus olfactorius notwendig sind. So wurde von Carbone *et al.* (CARBONE *et al.*, 1993) die Rolle des *Nerve growth factors* (NGF) für eine vermehrte Transkription und Translation *in vivo* diskutiert.

Die Ergebnisse lassen den Schluss zu, dass diese Kultur alleine nur bedingt als Ersatz zum Tierversuch gesehen werden kann.

5.5 CO-KULTUR AUS OLFAKTORISCHEM EPITHEL UND OLFAKTORISCHEN HÜLLZELLEN

5.5.1 Nachweis von BDV-N

Vor dem eigentlichen Versuch der Co-Kultivierung der olfaktorischen Hüllzellen mit den Zellen aus dem olfaktorischen Epithel musste sichergestellt werden, dass die caninen OECs prinzipiell mit dem verwendeten Virus infizierbar sind, da eine an die Ratte adaptierte Viruspräparation verwendet wurde. Die zur Verfügung stehenden OECs stammten aus dem Riechepithel des Hundes. Bislang existiert nur ein gesicherter Bericht über eine BDV-Infektion des Hundes (WEISSENBÖCK *et al.*, 1998). Allerdings werden die aus dem Hund stammenden MDCK-Zellen (*Madin Darby canine kidney*) seit langem als persistent infizierbare Zellkultur zur Diagnostik einer BDV-Infektion verwendet (HERZOG und ROTT, 1980). Dies spricht dafür, dass der oder die Rezeptoren, die das BDV zur Infektion der Zellen benötigt, nicht sehr speziesspezifisch sein können. In der vorliegenden Studie zeigte sich, dass die OECs des Hundes sehr gut mit BDV infizierbar waren. Sie zeigten die für viele

Zellen typische granuläre Kernreaktion (HERZOG und ROTT, 1980). Diese konnte auch in den OECs der Ratte bei der Infektion der Dissoziationskultur des olfaktorischen Epithels gesehen werden (4.3.2.1). Es zeigte sich, dass in den beiden untersuchten Kulturpassagen nach 6 Tagen durchschnittlich ca. 60 % der OECs positiv für BDV-N waren. Dieser Anteil lag damit deutlich höher als der Anteil der infizierten Zellen in der Kultur des olfaktorischen Epithels der Ratte, wo die OECs nur einen Teil an der Gesamtzellzahl ausmachten. Dies kann ein Zeichen dafür sein, dass die Virusvermehrung in diesem Zelltyp besonders effizient funktioniert. Dass OECs eine besonders wichtige Rolle im Rahmen einer Virusinfektion hinsichtlich der Ausbreitung vom olfaktorischen Epithel ins ZNS spielen und *in vitro* insbesondere die Virusreplikation fördern können, konnte bereits für das humane Herpesvirus 6 gezeigt werden (HARBERTS *et al.*, 2011) und ist so auch für die BDV-Infektion anzunehmen. Folglich kann der Anteil infizierter Zellen aus diesem Grund in der Kultur der OECs höher sein als in der Dissoziationskultur des olfaktorischen Epithels, wo die OECs nur einen kleinen Anteil an der Gesamtzellzahl ausmachen. Allerdings ist zu sagen, dass sich die OECs vermehren, wenn sie das geeignete Nährmedium erhalten. Hinsichtlich der Infektionseffizienz sind die in dieser Studie ausgewerteten Kulturen der OECs nicht ohne Vorbehalt mit den Kulturen des olfaktorischen Epithels der Ratte vergleichbar, wo unter den angewendeten Kulturbedingungen keine nennenswerte Zellvermehrung stattfand. Dadurch dass die Zellen in der Kultur der OECs nach einer gewissen Zeit dichter beieinander lagen, kann möglicherweise die Infektion der Nachbarzellen leichter vonstatten gegangen sein. Dies kann auch der Grund dafür sein, dass in den zwei unterschiedlichen Passagen der OECs deutliche Unterschiede im Anteil infizierter Zellen zu sehen waren. Dies passt zu den Beobachtungen im olfaktorischen Epithel der Ratte *in vivo* aus der vorliegenden Studie. Da dort BDV-N in Zellen nachweisbar war, die höchstwahrscheinlich keinen direkten Kontakt mit dem BDV während der Infektion hatten, ist anzunehmen, dass sich das Virus über benachbarte Zellen ausgebreitet hat. Dies wurde *in vitro* auch bereits in anderen Studien beobachtet (LENNARTZ *et al.*, 2015). Darüber hinaus werden diese Daten dadurch bestätigt, dass *in vitro* und *in vivo* nur wenig bzw. kein freies Virus nachweisbar ist (GOSZTONYI *et al.*, 1993). Trotz allem ist 6 dpi der Anteil von 49 % infizierten Zellen in der schlechter infizierten Passage deutlich höher als der in der Kultur des olfaktorischen Epithels ermittelte Wert von durchschnittlich 29 % nach 14 Tagen. Insgesamt unterstreichen diese Ergebnisse die Relevanz der OECs bei neurotrophen Virusinfektionen. Es wurde gezeigt, dass sie sehr gut infizierbar sind und den Viren mit ihrer Nähe zu den Nervenfasern eine optimale Weiterleitung ins ZNS ermöglichen. Zudem wird ihnen eine gliartige Funktion zugesprochen (BABIARZ *et al.*, 2011), was sie auch hinsichtlich der trophische Faktoren unentbehrlich für die Nervenfasern der olfaktorischen Neurone machen dürfte.

5.5.2 Quantifizierung von BDV-RNA

Um zusätzlich zum morphologischen Nachweis *in vivo* quantitative Daten zur Virusreplikation und Transkription *in vitro* zu erhalten, wurde die Menge von BDV-mRNA und genomischer RNA bei der Co-Kultivierung der Dissoziationskultur des olfaktorischen Epithels und der Kultur der OECs mittels *real time* RT-PCR bestimmt und ins Verhältnis gesetzt. In der vorliegenden Studie wurden Unterschiede in den Größenordnungen der GAPDH-Kopienzahlen zwischen den verschiedenen Zellkulturansätzen, Reinkultur des olfaktorischen Epithels der Ratte und der OECs des Hundes sowie zwei verschiedene Mischungsansätze aus beiden Kulturen, nachgewiesen. Dies war darauf zurückzuführen, dass die verwendete Sonde und die Primer der rattenspezifischen Sequenz für GAPDH entsprachen. Da die Sequenz des Hundes leicht von der der Ratte abweicht, musste mit einer schlechteren Bindung und Effizienz gerechnet werden. Dementsprechend wurden die erhobenen Daten nicht zwischen den Gruppen, sondern nur gruppenintern und bezogen auf den zeitlichen Verlauf verglichen. In diesem Versuchsteil sollten auch erste Hinweise erlangt werden, ob die OECs einen Einfluss auf die virale Replikation und Transkription in der Zellkultur haben.

Bei der Auswertung der Ergebnisse der Kultur des olfaktorischen Epithels fiel auf, dass zu beiden untersuchten Zeitpunkten (4 und 7 dpi) deutlich mehr genomische virale RNA als BDV-N mRNA pro Kopie GAPDH vorhanden war, wobei zum Untersuchungszeitpunkt 7 dpi eine Reduktion der Kopienzahl, insbesondere der viralen genomischen RNA, nachzuweisen war. Ein anderes Bild zeigte sich bei der Auswertung der reinen Kultur der OECs. Hier konnten 4 dpi wenige Kopien mehr mRNA als genomische RNA nachgewiesen werden. 7 dpi lag eine geringgradige Reduktion der genomischen RNA vor. Im Gegensatz dazu stieg die Anzahl der BDV-N mRNA-Kopien leicht an. Sowohl im Mischverhältnis 3:1 als auch im Verhältnis 1:1 olfaktorisches Epithel zu OECs war 4 dpi mehr BDV-N mRNA als genomische RNA detektierbar. 7 dpi war jedoch in beiden Ansätzen das Verhältnis wieder zugunsten der genomischen viralen RNA verschoben.

Zusammenfassend sprechen diese Ergebnisse dafür, dass in der Dissoziationskultur des olfaktorischen Epithels mehr Virusreplikation als Transkription stattfand und dass eine Reduktion beider Prozesse, jedoch in besonderem Maße der Replikation zum Zeitpunkt 7 dpi nachzuweisen war. Korreliert man diese Ergebnisse mit dem morphologischen Nachweis von BDV-N mittels Immunfluoreszenz (4.3.2.1), so zeigt sich, dass die Reduktion der BDV-N-spezifischen RNA zu einem Zeitpunkt stattfand, bei dem die Kultur bereits sicher infiziert war und eine Zunahme von BDV-N nachgewiesen wurde. Möglicherweise reduzierte das Virus zu diesem Zeitpunkt die Replikation zugunsten der Transkription. Jedoch ist es denkbar, dass 7 dpi ebenfalls die Transkription bereits leicht verringert sein kann, da zu diesem Zeitpunkt bereits eine Vielzahl von Zellen positiv für BDV-N waren. Das BDV nutzt

verschiedene Strategien zur Aufrechterhaltung einer nicht-zytolytischen Infektion, die auch zur Etablierung der Viruspersistenz beitragen kann. Dazu gehört unter anderem, dass die 3'- und 5'-Enden der genomischen und antigenomischen RNA modifiziert werden, was sich negativ auf die Replikationseffizienz auswirkt. Dies könnte ein Vorgang sein, der erklärt warum die Replikation von 4 auf 7 dpi deutlich abnimmt (ROSARIO *et al.*, 2005; SCHNEIDER, 2005; SCHNEIDER *et al.*, 2005), wobei mit diesen Untersuchungszeitpunkten lediglich Aussagen zu der akuten Phase der BDV-Infektion möglich sind. Weiterhin spielen auch die Verhältnisse von BDV-N zu BDV-P sowie von BDV-X zu BDV-P eine wichtige Rolle. Außerdem liegt, wie bei anderen Viren der Ordnung *Mononegavirales* auch, ein Transkriptionsgradient in 3' zu 5' Richtung vor (WOLFF *et al.*, 2000; TOMONAGA *et al.*, 2002; ROSARIO *et al.*, 2005; SCHNEIDER, 2005; SCHNEIDER *et al.*, 2005; YANAI *et al.*, 2006; CHASE *et al.*, 2007; HERDEN, 2009; HERDEN *et al.*, 2013).

Die bei der Auswertung der reinen OEC-Kultur gewonnenen Ergebnisse sprechen dafür, dass die OECs *in vitro* stärker die Transkription als die Replikation des BDV fördern. Dies deckt sich zeitlich mit den Ergebnissen zum morphologischen Nachweis von BDV-N in OECs *in vitro* (3.5.2.2). Hier waren bereits nach 6 Tagen weitaus mehr BDV-N-positive Zellen zu erkennen als es nach 14 dpi in der Kultur des olfaktorischen Epithels möglich war, was für eine effektive Transkription mit nachfolgender Translation spricht.

Dass die OECs *in vitro* die Transkription fördern, spiegelt sich ebenfalls in den Ergebnissen der beiden Ansätze der Co-Kulturen wider, da das Verhältnis der genomischen viralen RNA zu der BDV-N mRNA deutlich zugunsten der mRNA verschoben ist, was insbesondere 4 dpi zum Tragen kommt. 7 dpi ist hingegen wieder mehr genomische virale RNA als mRNA vorhanden, was dafür spricht, dass wieder mehr Replikation stattfindet. Allerdings ist anteilmäßig trotzdem mehr genomische RNA in beiden Co-Kulturen als in der reinen Kultur des olfaktorischen Epithes nachzuweisen, sodass auch eine Replikation leichter abzulaufen scheint.

Die Ergebnisse aus der reinen Dissoziationskultur des olfaktorischen Epithels stehen im Gegensatz zu den Daten aus den Infektionsversuchen *in vivo* (4.2.4.2). Während zum Untersuchungszeitpunkt 4 dpi noch keine genomische virale RNA im olfaktorischen Epithel der Ratte nachweisbar war, war in allen untersuchten Kulturansätzen konstant genomische RNA vorhanden. Hinsichtlich der BDV-N mRNA konnte im olfaktorischen Epithel der Ratte eine leichte durchschnittliche Erhöhung von 4 dpi zu 7 dpi beobachtet werden, wohingegen in der Dissoziationskultur eine leichte Reduktion der mRNA auffiel. Zum Untersuchungszeitpunkt 7 dpi konnte geringfügig mehr mRNA als virale genomische RNA im olfaktorischen Epithel *in vivo* nachgewiesen werden, wohingegen *in vitro* ein umgekehrtes Verhältnis detektiert wurde. Es ist nicht auszuschließen, dass diese Diskrepanzen durch die stetige Abnahme der olfaktorischen Neurone in der Kultur bedingt sind. Denkbar ist, dass

sich mit der Änderung der zellulären Zusammensetzung auch die Effizienz der Virusausbreitung ändert. In den OECs des olfaktorischen Epithel der Ratte war genomische virale RNA erstmalig 7 dpi und mRNA erst 14 dpi nachweisbar. Dies war in der Kultur der OECs bereits zu dem frühen Untersuchungszeitpunkt 4 dpi möglich. Es ist davon auszugehen, dass diese Zellen aufgrund ihrer Lage unterhalb des olfaktorischen Epithels *in vivo* nicht direkt mit dem Virus in Kontakt kommen können, weshalb sie in der Rattennase erst viel später Hinweise auf die BDV-Infektion zeigen. Um speziesspezifische Besonderheiten auszuschließen, die einen Einfluss auf Replikation und Transkription haben könnten, soll in kommenden Versuchen mit olfaktorischen Hüllzellen der adulten Ratte gearbeitet werden.

Die in dieser Studie gewonnenen Erkenntnisse unterstreichen die Rolle der OECs während einer BDV-Infektion, die *in vitro* eindeutig den Prozess der Transkription fördern und damit eine Schaltstelle sein können, die für eine erfolgreiche Ausbreitung in das Gehirn nötig ist. Auch *in vivo* scheinen diese Zellen wichtig für die Ausbreitung des humanen Herpesvirus 6 ins Gehirn zu sein (HARBERTS *et al.*, 2011). Dies konnte auch in der vorliegenden Studie für BDV bestätigt werden, da gleichzeitig mit dem Nachweis von BDV-N in diesen Zellen *in vivo* auch erstmalig virales Antigen im Gehirn nach der intranasalen Infektion nachzuweisen war (3.2.4). Initial reichte daher die Infektion einiger wenigen Zellen des olfaktorischen Epithels aus, um eine erfolgreiche Ausbreitung des Virus in das Gehirn zu ermöglichen. Es konnte gezeigt werden, dass die olfaktorischen Hüllzellen einen großen Teil zu der erfolgreichen Ausbreitung beitragen. Um auszuschließen, dass die Diskrepanzen zwischen den Ergebnissen der Untersuchungen *in vivo* und *in vitro* alleine durch die Nachweismethode bedingt sind, empfiehlt es sich, ebenfalls eine quantitative *real time* RT-PCR des olfaktorischen Epithels BDV-infizierter Ratten durchzuführen. In weiteren Untersuchungen sollen nun speziesspezifische oder universelle Primer-Sonden-Kombinationen genutzt werden. Durch die Verwendung von OECs aus adulten Ratten kann der Einfluss der Spezies auf die Untersuchungsergebnisse minimiert werden. So kann die Rolle der OECs bei der Virusvermehrung und damit erfolgreichen Ausbreitung in das Gehirn weiter aufgeklärt werden sowie die Rolle der anderen viralen Proteine eingehend untersucht werden.

5.6 SCHLUSSBETRACHTUNG

Ein Ziel dieser Arbeit war die morphologische Charakterisierung des olfaktorischen Epithels des Pferdes und der Vergleich mit dem der Ratte. Hinsichtlich Struktur und zellulären Bestandteilen ähnelte das olfaktorische Epithel des Pferdes stark dem anderer Spezies wie Ratte und Hund. Unterschiede waren vor allem im detaillierten Vergleich der Typen des olfaktorischen Epithels zu finden, die jedoch bislang nur für den Hund (BOCK *et al.*, 2009)

und nicht für Nagetiere beschrieben wurden. Bezogen auf die Verteilung des olfaktorischen Epithels innerhalb der Pferdenase fand sich eine signifikante Abnahme des Epithels in rostraler Richtung. Der größte Anteil des olfaktorischen Epithels war auf den Nasenmuscheln zu finden und nur ausnahmsweise auch auf dem Nasenseptum oder in der epithelialen Auskleidung der knöchernen Begrenzung der Nasenhöhle. Hinsichtlich des Expressionsprofils lag eine Übereinstimmung der meisten gängigen Marker zur Darstellung der neuronalen Komponenten des olfaktorischen Epithels und deren Vorläuferzellen für Ratte und Pferd vor. Aufgedeckte Unterschiede sind möglicherweise durch das Alter der Tiere, die Gewebeaufarbeitung oder durch den Marker selbst bedingt. Zur abschließenden Klärung sind weiterführende Untersuchungen, wie beispielsweise weitere Untersuchungen zur Proteinexpression, notwendig.

Daneben war es Ziel dieser Arbeit, die initiale Phase der Infektion mit dem BDV zu untersuchen, da diese bislang nur unzureichend charakterisiert war. Insgesamt sprach der Nachweis von BDV-N, korrespondierender mRNA und genomischer RNA dafür, dass eine initiale Virusvermehrung mit erfolgreicher Transkription, Replikation sowie Translation bereits im olfaktorischen Epithel stattfindet, wobei BDV-N in allen untersuchten Zellen, BDV-RNA jedoch nur in adulten und juvenilen Neuronen sowie in den Nervenfasern und in den olfaktorischen Hüllzellen detektierbar war. Außerdem konnte eine signifikante Zunahme der positiven Zellen im olfaktorischen Epithel nachgewiesen werden, bevor der Virusnachweis im Gehirn gelang, was ebenfalls die Vermutung unterstützt, dass sich BDV im olfaktorischen Epithel vermehrt. Die initiale Infektion von einigen wenigen Zellen reichte demnach aus, um eine erfolgreiche Virusausbreitung ins Gehirn sicher zu stellen.

Weiterhin sollten im Rahmen der Untersuchung der initialen Phase der BDV-Infektion *In-vitro*-Modelle entwickelt werden, die sich als Ersatzmethoden zum Tierversuch eignen. Insbesondere die Dissoziationskultur des olfaktorischen Epithels der adulten Ratte erwies sich aufgrund übereinstimmender Ergebnisse der Versuche *in vitro* und *in vivo* als geeignet hierfür. In beiden Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass auch nicht-neuronale Zellen positiv für BDV-N sind und dass eine stetige Zunahme positiver Zellen im Laufe der Zeit gesehen werden konnte.

Um die Rolle der olfaktorischen Hüllzellen während der initialen Phase der BDV-Infektion zu untersuchen, wurde eine Co-Kultivierung der Dissoziationskultur des olfaktorischen Epithels mit OECs durchgeführt. Es wurde nachgewiesen, dass dieser Zelltyp *in vitro* die Transkription des BDV förderte. Zusammen mit dem Nachweis von BDV-N in diesen Zellen *in vivo* zeitgleich mit dem Nachweis von BDV-N im Gehirn spricht dies für eine wichtige Funktion zur effizienten Infektionsausbreitung.

Weitere Studien hinsichtlich der Proteinexpression des olfaktorischen Epithels und der Vergleich der Tierarten können zusätzliche wichtige Hinweise auf die Funktionsweise liefern

und helfen, mögliche Rezeptoren für BDV zu identifizieren. Nur mit diesen umfassenden Kenntnissen lassen sich gezielt antivirale Interventions- und Prophylaxemaßnahmen entwickeln. Die Weiterentwicklung der Dissoziationskultur des olfaktorischen Epithels der Ratte sowie die Etablierung einer Kultur der OECs aus adulten Ratten ist anzustreben, um die initiale Phase der BDV-Infektion noch eingehender untersuchen zu können.

6. ZUSAMMENFASSUNG / SUMMARY

6.1 ZUSAMMENFASSUNG

Die Rolle des olfaktorischen Epithels in der initialen Phase der Infektion mit dem neurotrophen *Borna disease virus*

Alexandra Kupke

1. Ein Ziel dieser Arbeit war die detaillierte morphologische Charakterisierung des olfaktorischen Epithels (OE) des Pferdes, einem der Haupt- bzw. Fehlwirte des klassischen Virus der Bornaschen Krankheit (BDV), und der Vergleich mit dem olfaktorischen Epithel der Ratte, einem seit langem etablierten Tiermodell zur Untersuchung dieser neurotrophen Virusinfektion. Durch die Untersuchung der Zytoarchitektur und der Proteinexpression auf zellulärer Ebene sollten speziesspezifische Unterschiede und Gemeinsamkeiten aufgedeckt werden, um zu bestimmen, ob gleichartige Infektionswege über dieses Epithel vorliegen können. Die initiale Phase der BDV-Infektion war bislang nur unzureichend charakterisiert. Bei welchen Zellen des olfaktorischen Epithels es sich um die primären Zielzellen des Virus handelt und ob eine Virusvermehrung im Epithel für eine erfolgreiche Ausbreitung ins ZNS notwendig ist, war bisher unbekannt und war daher ein Teil der Fragestellung dieser Arbeit. Darüber hinaus sollten *In-vitro*-Modelle für die BDV-Infektion entwickelt und auf ihre Eignung als Ersatz für einen Tierversuch im Sinne des 3R-Prinzips getestet werden.

2. Um das olfaktorische Epithel des Pferdes morphologisch zu charakterisieren, wurden die Nasen von 5 Pferden vollständig histologisch aufgearbeitet. Das OE fand sich vornehmlich auf den drei Nasenmuscheln, wobei eine deutliche Reduktion in rostraler Richtung zu erkennen war.

Wie bei Bock *et al.* (BOCK *et al.*, 2009) für den Hund beschrieben, konnten auch beim Pferd zwei Typen des OEs gefunden werden, die ähnliche morphologische Kriterien aufwiesen. Während bei Bock *et al.* im Typ A vorwiegend reife und im Typ B unreife Neurone dominierten, konnte diese Beobachtung für das Pferd nicht im selben Ausmaß bestätigt werden. Trotzdem war eine gute Unterscheidung der Epitheltypen beim Pferd möglich. Für das gesamte OE wurde eine Abnahme in rostraler Richtung beobachtet, die allerdings für den Typ A stärker ausgeprägt war, sodass ab Scheibe C der untersuchten Nasen der Typ B dominierte.

Bei der immunhistologischen Untersuchung des OEs wurde für die adulten olfaktorischen Neurone der Marker OMP (*Olfactory marker protein*) und für die juvenilen Neurone der Marker DCX (*Doublecortin*) verwendet. Die proliferierenden Basalzellen wurden aufgrund

ihrer Expression von PCNA (*Proliferating cell nuclear antigen*) und die horizontalen Basalzellen durch ihre TrkA-Expression (Tyrosinkinase-Rezeptor-A) identifiziert. Mittels Rangkorrelationskoeffizient nach Spearman wurde ermittelt, dass die Marker OMP und DCX in mehr Zellen des olfaktorischen Epithels Typ A exprimiert wurden als in Typ B. Ein umgekehrtes Bild zeigte sich für die Marker PCNA und TrkA. Folglich wurden im Epithel Typ B vermehrt Proteine der Vorläuferzellen exprimiert, was zur Beobachtung von Bock *et al.* passt, dass der Typ A das reife und der Typ B das unreife olfaktorische Epithel repräsentiert. Insgesamt konnten bei der speziesübergreifenden Betrachtung vergleichbare Ergebnisse für Pferd und Ratte ermittelt werden. Ob die aufgedeckten kleineren Diskrepanzen in der Nachweisbarkeit einiger Marker durch das Alter der untersuchten Tiere oder durch methodische Unterschiede verursacht wurden, sollte durch weiterführende Untersuchungen geklärt werden.

3. Um die Initialphase der BDV-Infektion zu untersuchen, wurden Lewis-Ratten intranasal mit dem BDV infiziert und über einen Zeitraum von bis zu 21 Tagen p.i. beobachtet. Die Nasen und Gehirne wurden zu verschiedenen Zeitpunkten zwischen 3 hpi und 21 dpi histopathologisch untersucht. Keines der Tiere zeigte im Beobachtungszeitraum klinische Symptome und auch in der histopathologischen Untersuchung fanden sich keine entzündlichen Veränderungen in der Nase oder dem ZNS.

Immunhistologisch war das BDV-N erstmalig 4 dpi in adulten olfaktorischen Neuronen in 2 von 5 Ratten nachweisbar. Über den gesamten Zeitraum bis 21 dpi nahm die Anzahl der positiven Zellen signifikant zu, was mittels des exakten Kruskal-Wallis-Tests bestätigt wurde. Außerdem konnte mit dem Rangkorrelationskoeffizient nach Spearman gezeigt werden, dass ein deutlicher Zusammenhang zwischen Zeit nach der Infektion und der Zahl positiver Zellen zu finden war und dass es sich bei der Zunahme um einen monotonen Trend handelte. Der Nachweis von BDV-N gelang in allen untersuchten Zellen, darunter adulte und juvenile olfaktorische Neurone, horizontale und proliferierende Basalzellen, Stützzellen, olfaktorische Hüllzellen sowie in den Nervenfasern unterhalb des olfaktorischen Epithels. BDV-N war erstmals 14 dpi im ZNS nachweisbar, gleichzeitig war es auch erstmals in den olfaktorischen Hüllzellen zu finden.

Ergänzend wurde für die Rattennasen zu allen Untersuchungszeitpunkten eine *In-situ*-Hybridisierung zum Nachweis von viraler genomischer und BDV-N mRNA durchgeführt. Genomische virale RNA war erstmals 7 dpi in adulten und juvenilen olfaktorischen Neuronen detektierbar. Bei einer Ratte gelang der Nachweis auch in den Nervenfasern und den olfaktorischen Hüllzellen. Die Zahl der positiven Zellen, darunter adulte und juvenile Neurone sowie olfaktorische Hüllzellen, und der Nervenfasern nahm bis 21 dpi stetig zu. Die korrespondierende mRNA war hingegen bereits 4 dpi in adulten Neuronen zu finden. In

juvenilen Neuronen, in olfaktorischen Hüllzellen und in Nervenfasern war BDV-N mRNA erst 14 dpi nachweisbar. Bis zum Untersuchungszeitpunkt 21 dpi konnte eine Zunahme der positiven Zellen und der Nervenfasern beobachtet werden. Für beide viralen RNAs konnte mittels des exakten Kruskal-Wallis-Tests gezeigt werden, dass die Zunahme positiver Zellen im Laufe der Zeit signifikant war. Mittels Rangkorrelationskoeffizient nach Spearman wurde gezeigt, dass ein deutlicher Zusammenhang zwischen Zeit nach der Infektion und der Anzahl positiver Zellen bestand und dass die Zunahme der Zellen einem monotonen Trend folgte. Insgesamt sprechen die Ergebnisse der Immunhistologie und der *In-situ*-Hybridisierung dafür, dass bereits eine initiale Virusvermehrung im olfaktorischen Epithel stattfindet, wobei zuerst die virale Transkription dominiert bevor auch die Virusreplikation anläuft. Auffallend war hierbei, dass BDV-N in allen untersuchten Zellen und in den Nervenfasern zu finden war, während die virale genomische RNA und die BDV-N mRNA nur in den adulten und juvenilen Neuronen sowie in den OECs und in den Nervenfasern vorkam.

4. Zum Studium der initialen Phase der BDV-Infektion *in vitro* wurde eine Dissoziationskultur des olfaktorischen Epithels der Ratte etabliert. Der Anteil der olfaktorischen Neurone lag dabei zwischen rund 33 % nach 4 Stunden und 6 % nach 7 Tagen in Kultur, sodass eine stetige Reduktion dieses Zelltyps beobachtet wurde. Nach BDV-Infektion wurde eine deutliche und stetige Virusausbreitung über die Zeit festgestellt. Waren 4 dpi erst durchschnittlich 11 % der Zellen infiziert, so lag dieser Anteil 14 dpi bei 29 %. Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass nicht nur Zellen neuronalen Ursprungs in der Kultur infiziert werden, was auch morphologisch bestätigt werden konnte.

Die organotypische Gewebekultur des olfaktorischen Epithels lieferte nach BDV-Infektion keine zuverlässigen Ergebnisse. Zwar konnte generell eine erfolgreiche Infektion erstmals 4 dpi nachgewiesen werden, allerdings war dies nur unregelmäßig der Fall, sodass sich dieses Kultursystem nicht ohne weitere Modifikationen als Ersatz zum Tierversuch eignet.

Durch die Co-Kultivierung von olfaktorischen Hüllzellen mit der Dissoziationskultur des olfaktorischen Epithels konnte gezeigt werden, dass die OECs *in vitro* die Transkription des BDV fördern. Dies wurde mittels quantitativer *real time* RT-PCR durch den Vergleich des Gehalts genomischer viraler RNA zu BDV-N mRNA nach 4 und 7 dpi belegt. Während in der reinen Kultur des olfaktorischen Epithels stets mehr genomische virale RNA als BDV-N mRNA nachzuweisen war, waren sowohl in beiden untersuchten Mischungsverhältnissen als auch in der reinen Kultur der OECs die Verhältnisse deutlich zugunsten der viralen mRNA verschoben.

5. In der vorliegenden Arbeit wurde zusammenfassend gezeigt, dass das olfaktorische Epithel des Pferdes hinsichtlich morphologischer Struktur, zellulärer Bestandteile und

Expressionsprofil der zellulären Marker sehr dem anderer Spezies wie Ratte und Pferd ähnelte, wobei speziesspezifische Unterschiede vor allem beim detaillierten Vergleich der verschiedenen Typen, wie sie von Bock *et al.* für den Hund beschrieben worden waren, auffielen. Insgesamt konnte eine signifikante Abnahme des olfaktorischen Epithels, welches in erster Linie auf den Nasenmuscheln lokalisiert war, in rostraler Richtung beobachtet werden. Durch die Infektionsversuche *in vivo* ließ sich nachweisen, dass eine initiale Virusvermehrung mit erfolgreicher Replikation, Transkription und Translation stattfand. BDV-N war dabei in allen untersuchten Zellen, virale genomische und mRNA jedoch nur in den juvenilen und adulten Neuronen sowie in den Nervenfasern und olfaktorischen Hüllzellen nachzuweisen. Die kann auf eine vermehrte Translation in den Stützzellen und in beiden Typen der Basalzellen hinweisen oder durch die Aufnahme viraler Proteine in diese Zellen sein. Der gleichzeitige Nachweis von BDV-N in den olfaktorischen Hüllzellen und im Gehirn deutet auf eine wichtige Rolle dieses Zelltyps während der Virusausbreitung ins ZNS hin. *In vitro* konnte ebenfalls gezeigt werden, dass nicht nur adulte olfaktorischen Neurone, sondern auch andere Zellen des olfaktorischen Epithels infizierbar sind. Durch die Co-Kultivierung mit zusätzlichen olfaktorischen Hüllzellen ließ sich nachweisen, dass diese Zellen *in vitro* die Transkription des BDV fördern, sodass dieser Zelltyp eine wichtige Rolle für eine erfolgreiche Virusausbreitung in das Gehirn einzunehmen scheint. In dieser Arbeit konnte die Bedeutung des olfaktorischen Epithels während der initialen Phase der BDV-Infektion verdeutlicht werden. Nur mittels fundierter Kenntnisse der Zytoarchitektur und des zellulären Expressionsprofils lassen sich zukünftig die zu untersuchenden molekularen Mechanismen und die Pathogenese der Infektion mit neurotrophen Viren detailliert aufklären.

6.2 SUMMARY

The role of the olfactory epithelium during the initial phase of the infection with the neurotropic Borna disease virus

Alexandra Kupke

1. One main goal of the present study was the detailed morphologic characterization of the olfactory epithelium (OE) of horses, one of the dead-end hosts of the classical Borna disease virus (BDV), and the comparison with the olfactory epithelium of rats, a well-established model for the neurotropic BDV infection. To determine if similar olfactory pathways could be used as a way of viral entry in these species, the epithelium was examined for its cytoarchitecture and protein expression on a cellular level with special emphasis on species-specific similarities and differences. To date, the initial phase of the BDV infection has been characterized inadequately. The primary olfactory target cells for BDV were largely unknown

as well as the question whether an initial virus replication in the OE is necessary for successful spreading to the CNS. Therefore, these questions were addressed in the present thesis. Another aim was to establish *in vitro* models for BDV infection in order to replace animal experiments according to the 3R principle.

2. To characterize the equine OE morphologically, the nose of 5 horses was completely processed for histology. The OE was mainly found on the nasal turbinates and a clear reduction towards the rostral areas of the nose was observed.

As described for the canine OE by Bock *et al.* (BOCK *et al.*, 2009), two types of the OE were also found in the equine OE with comparable morphological details. While in Bock *et al.* the epithelium type A contained predominantly mature olfactory receptor neurons, in type B the juvenile neurons prevailed. This observation could not be confirmed to the same extent for the equine OE in the present study. Nevertheless, both types of OE were also confirmed for the equine olfactory epithelium. As the amount of the OE decreased in rostral direction, this was especially seen for the epithelium type A, resulting in a higher prevalence of type B from nasal section C onwards. By immunohistochemistry mature olfactory neurons were stained by expression of Olfactory marker protein (OMP). Doublecortin (DCX) was used for identification of juvenile neurons whereas the proliferating basal cells were stained with Proliferating cell nuclear antigen (PCNA) and the horizontal basal cells with TrkA (tyrosine-kinase receptor A). By spearman's rank correlation it was determined that more cells of the OE type A expressed OMP and DCX than cells of type B. For PCNA and TrkA a reverse expression pattern was found, thus, more cells expressed markers specific for precursor cells in epithelium type B.

Taken together, the expression profile of the equine olfactory epithelium was quite comparable to rat OE. Whether the observed variability in the detectability of some markers was due to age of the horses used in the study or were caused by different methodological approaches remains to be clarified in further studies.

3. To investigate the initial phase of the BDV infection, Lewis rats were infected intranasally with BDV and were monitored up to 21 dpi. The noses and brain of the infected animals were examined at different time points between 3 hpi and 21 dpi. None of the rats developed clinical symptoms and neither in the nose nor in the CNS signs of inflammation were detected histologically.

The BDV nucleoprotein (BDV-N) was found for the first time 4 dpi in mature olfactory neurons in 2 of 5 rats by immunohistochemistry. A significant increase of positive cells was observed over the whole investigation period, confirmed by the means of an exact Kruskal-Wallis test. Moreover, the spearman's rank correlation showed a clear correlation between

time post infection and number of positive cells and that the increase of cells over time represented a monotonous trend. The detection of BDV-N was successful in all cells examined, amongst them mature and immature olfactory neurons, horizontal and proliferating basal cells, sustentacular cells, olfactory ensheathing cells and nerve fibers underneath the olfactory epithelium. In the CNS, BDV-N was present from 14 dpi on, correlating with the first detection in OECs.

Additionally, *in situ* hybridization of the nasal tissue was performed to detect genomic viral RNA and BDV-N mRNA. Genomic viral RNA was first detected 7 dpi in adult and juvenile olfactory neurons. In one rat this was also possible for the nerve fibers and OECs. The number of positive cells and structures, including mature and immature olfactory neurons, nerve fibers and olfactory ensheathing cells, clearly increased until 21 dpi. However, the corresponding mRNA was already present 4 dpi in mature olfactory neurons. In juvenile neurons, OECs and in nerve fibers BDV-N mRNA was found from 14 dpi on. Until 21 dpi an increase of positive cells and nerve fibers was observed. For both types of mRNA, the increase of positive cells over time was significant using the exact Kruskal-Wallis test. By the spearman's rank correlation a strong correlation of time post infection and number of positive cells was confirmed and that the increase of positive cells represented a monotonous trend. In summary, the results of immunohistochemistry and *in situ* hybridization point to the conclusion that an initial viral propagation took place in the olfactory epithelium in which the transcription dominates before the viral replication becomes more important. Conspicuously, BDV-N was found in all cells examined and in the nerve fibers, while viral genomic RNA and BDV-N mRNA was only present in adult and juvenile neurons as well as in OECs and nerve fibers.

4. In order to study the initial phase of the BDV infection *in vitro*, a primary cell culture of the rat olfactory epithelium was established. The percentage of the olfactory neurons was 33 % after 4 hours in culture, decreasing continuously to 6 % after 7 days in culture. After BDV infection viral spread was observed over time with about 11 % of infected cells at 4 dpi. This amount increased up to 29 % at 14 dpi. These results suggest that not only cells of neuronal origin were infected, which could be approved morphologically by immunofluorescence.

The organotypic tissue culture as used in the current study was not suitable to reproduce satisfactory results after BDV infection. An infection was detectable from 4 dpi on only in some cultured tissues. Consequently this culture system has to be further optimized before it might be used as a replacement method according to the 3R principle.

By the means of co-culturing the culture of the olfactory epithelium with additional olfactory ensheathing cells, it was shown that the OECs were able to promote viral transcription *in vitro* very sufficiently. In detail, the amount of genomic viral RNA was compared to BDV-N

mRNA by quantitative real time RT-PCR at 4 and 7 dpi. While in the cell culture of the olfactory epithelium the amount of genomic viral RNA than mRNA content, more mRNA was constantly found in the cell culture of the OECs as well as in both mixed co-cultures containing 3:1 or 1:1 cells of the olfactory epithelium and OECs, respectively.

5. In summary, in the present study it was demonstrated that the equine olfactory epithelium closely resembles those of other species like rodents and dogs regarding morphological structure, cellular components and expression profile of several cellular markers. Species-specific disparities were observed for the detailed comparison of the two distinct types of the olfactory epithelium described by Bock *et al.* (BOCK *et al.*, 2009) for the dog. In general, a significant decrease of the amount of the OE, which was mainly located on the nasal turbinates, was detected in rostral direction. By *in vivo* experiments an initial viral proliferation, including replication, transcription and translation was confirmed in the olfactory epithelium. While BDV-N was detected in all cellular components examined, genomic viral RNA and BDV-N mRNA were only found in mature and immature olfactory neurons, OECs and nerve fibers. This may be due to an enhanced translation in the sustentacular cells and in both types of basal cells in comparison to transcription and replication or due to an uptake of viral proteins. Simultaneously, BDV-N was present in the OECs and the brain at the same time, underscoring the importance of these cells for an efficient viral propagation. Furthermore it was confirmed *in vitro* that not only mature olfactory neurons but also other cell types of the OE were infected with BDV. By the means of a co-culture containing cells of the OE and a culture of the OECs it was demonstrated that the OECs promote viral transcription *in vitro* substantiating the role of this cell type for successful viral spread into the brain. In this work the role of the olfactory epithelium during the initial phase of the BDV infection was highlighted and confirmed. Knowledge of the cellular architecture and the cellular expression profile represents an essential prerequisite to investigate the molecular mechanisms and pathogenesis of the intranasal infection with neurotropic viruses.

7. LITERATURVERZEICHNIS

- ACKERMANN, A., STAEHELI, P., SCHNEIDER, U. (2007). Adaptation of Borna disease virus to new host species attributed to altered regulation of viral polymerase activity. *J Virol* 81(15): 7933-7940.
- AFONSO, P. V., OZDEN, S., CUMONT, M. C., SEILHEAN, D., CARTIER, L., REZAIE, P., MASON, S., LAMBERT, S., HUERRE, M., GESSAIN, A., COURAUD, P. O., PIQUE, C., CECCALDI, P. E., ROMERO, I. A. (2008). Alteration of blood-brain barrier integrity by retroviral infection. *PLoS Pathog* 4(11): e1000205.
- AHLEMEYER, B., BAUMGART-VOGT, E. (2005). Optimized protocols for the simultaneous preparation of primary neuronal cultures of the neocortex, hippocampus and cerebellum from individual newborn (P0.5) C57Bl/6J mice. *J Neurosci Methods* 149(2): 110-120.
- ALEND, R., ALVAREZ-LAFUENTE, R., COSTA-FROSSARD, L., ARROYO, R., MIRETE, S., ALVAREZ-CERMENO, J. C., VILLAR, L. M. (2014). Identification of the major HHV-6 antigen recognized by cerebrospinal fluid IgG in multiple sclerosis. *Eur J Neurol*.
- ALEXAKI, A., WIGDAHL, B. (2008). HIV-1 infection of bone marrow hematopoietic progenitor cells and their role in trafficking and viral dissemination. *PLoS Pathog* 4(12): e1000215.
- ALGERMISSEN, D., POROMBKA, D., SCHAUDIEN, D., KRAMER, K., BAUMGÄRTNER, W., HERDEN, C. (2007a). Vortrag: Expression profile of Borna disease virus specific proteins and RNAs in naturally infected horses. 25th Meeting of the European Society of Veterinary Pathologists, München.
- ALGERMISSEN, D., POROMBKA, D., SCHAUDIEN, D., KRAMER, K., BAUMGÄRTNER, W. and HERDEN, C. (2007b). Vortrag: Nachweis von Borna Disease Virus-spezifischen Proteinen und deren RNAs in natürlich infizierten Pferden. 50. Tagung der DVG Fachgruppe „Allgemeine Pathologie und Pathologische Anatomie“, Fulda.
- ALLMANG, U., HOFER, M., HERZOG, S., BECHTER, K., STAEHELI, P. (2001). Low avidity of human serum antibodies for Borna disease virus antigens questions their diagnostic value. *Mol Psychiatry* 6(3): 329-333.
- ALTMANN, D., KRONBERGER, H., SCHUEPPEL, K. F., LIPPMANN, R., ALTMANN, I. (1976). Bornasche Krankheit bei Neuwelttylopiden und Equiden. 13. Internationaler Kongress über die Erkrankungen von Zootieren, Innsbruck.
- ALVES, L., KHOSRAVI, M., AVILA, M., ADER-EBERT, N., BRINGOLF, F., ZURBRIGGEN, A., VANDEVELDE, M., PLATTET, P. (2015). SLAM and Nectin-4-Independent Non-cytolytic Spread in Astrocytes by Canine Distemper Virus. *J Virol*.
- AMSTERDAM, J. D., WINOKUR, A., DYSON, W., HERZOG, S., GONZALEZ, F., ROTT, R., KOPROWSKI, H. (1985). Borna disease virus. A possible etiologic factor in human affective disorders? *Arch Gen Psychiatry* 42(11): 1093-1096.
- ARONSSON, F., ROBERTSON, B., LJUNGGREN, H. G., KRISTENSSON, K. (2003). Invasion and persistence of the neuroadapted influenza virus A/WSN/33 in the mouse olfactory system. *Viral Immunol* 16(3): 415-423.
- AUTHENRIETH, C. F. (1823). Über die hitzige Kopf-Krankheit der Pferde. Auf Verlangen des Müsinger-Vereins zur Beförderung der Pferdezeitung auf der Alp, und zunächst für diese Gegend. bey Heinrich, Tübingen: Laupp.

- BABIARZ, J., KANE-GOLDSMITH, N., BASAK, S., LIU, K., YOUNG, W., GRUMET, M. (2011). Juvenile and adult olfactory ensheathing cells bundle and myelinate dorsal root ganglion axons in culture. *Exp Neurol* 229(1): 72-79.
- BAJRAMOVIC, J. J., MUNTER, S., SYAN, S., NEHRBASS, U., BRAHIC, M., GONZALEZ-DUNIA, D. (2003). Borna Disease Virus Glycoprotein Is Required for Viral Dissemination in Neurons. *J Virol* 77(22): 12222-12231.
- BANERJEE, A. K., BARIK, S., DE, B. P. (1991). Gene expression of nonsegmented negative strand RNA viruses. *Pharmacol Ther* 51(1): 47-70.
- BARRIOS, A. W., NUNEZ, G., SANCHEZ QUINTEIRO, P., SALAZAR, I. (2014a). Anatomy, histochemistry, and immunohistochemistry of the olfactory subsystems in mice. *Front Neuroanat* 8: 63.
- BARRIOS, A. W., SANCHEZ QUINTEIRO, P., SALAZAR, I. (2014b). The nasal cavity of the sheep and its olfactory sensory epithelium. *Microsc Res Tech* 77(12): 1052-1059.
- BARRIOS, A. W., SANCHEZ-QUINTEIRO, P., SALAZAR, I. (2014c). Dog and mouse: toward a balanced view of the mammalian olfactory system. *Front Neuroanat* 8: 106.
- BARTHOLD, S. W. (1988). Olfactory neural pathway in mouse hepatitis virus nasoencephalitis. *Acta Neuropathol* 76(5): 502-506.
- BAUMGÄRTNER, W., ORVELL, C., REINACHER, M. (1989). Naturally occurring canine distemper virus encephalitis: distribution and expression of viral polypeptides in nervous tissues. *Acta Neuropathol* 78(5): 504-512.
- BAUTISTA, J. R., RUBIN, S. A., MORAN, T. H., SCHWARTZ, G. J. and CARBONE, K. M. (1995). Developmental injury to the cerebellum following perinatal Borna disease virus infection. *Brain Res Dev Brain Res* 90(1-2): 45-53.
- BAUTISTA, J. R., SCHWARTZ, G. J., DE LA TORRE, J. C., MORAN, T. H., CARBONE, K. M. (1994). Early and persistent abnormalities in rats with neonatally acquired Borna disease virus infection. *Brain Res Bull* 34(1): 31-40.
- BECHTER, K., HERZOG, S., FLEISCHER, B., SCHUTTLER, R., ROTT, R. (1987). [Findings with nuclear magnetic resonance tomography in psychiatric patients with and without serum antibodies to the virus of Borna disease]. *Nervenarzt* 58(10): 617-624.
- BEINEKE, A., PUFF, C., SEEHUSEN, F., BAUMGÄRTNER, W. (2009). Pathogenesis and immunopathology of systemic and nervous canine distemper. *Vet Immunol Immunopathol* 127(1-2): 1-18.
- BELIYI, V. A., LEVINE, A. J., SKALKA, A. M. (2010). Unexpected inheritance: multiple integrations of ancient bornavirus and ebolavirus/marburgvirus sequences in vertebrate genomes. *PLoS Pathog* 6(7): e1001030.
- BENARROCH, E. E. (2010). Olfactory system: functional organization and involvement in neurodegenerative disease. *Neurology* 75(12): 1104-1109.
- BERG, A. L., DORRIES, R., BERG, M. (1999). Borna disease virus infection in racing horses with behavioral and movement disorders. *Arch Virol* 144(3): 547-559.
- BIESENBACH, W., HERZOG, S., FRESE, K. (1990). Peripheral neuropathy in experimental Borna disease virus infection in Lewis rats. *Schweizer Archiv für Tierheilkunde*(132): 415.

- BILLICH, C., SAUDER, C., FRANK, R., HERZOG, S., BECHTER, K., TAKAHASHI, K., PETERS, H., STAEHELI, P., SCHWEMMLE, M. (2002). High-avidity human serum antibodies recognizing linear epitopes of Borna disease virus proteins. *Biol Psychiatry* 51(12): 979-987.
- BILZER, T., PLANZ, O., LIPKIN, W. I., STITZ, L. (1995). Presence of CD4+ and CD8+ T cells and expression of MHC class I and MHC class II antigen in horses with Borna disease virus-induced encephalitis. *Brain Pathol* 5(3): 223-230.
- BINZ, T., LEBELT, J., NIEMANN, H., HAGENAU, K. (1994). Sequence analyses of the p24 gene of Borna disease virus in naturally infected horse, donkey and sheep. *Virus Res* 34(3): 281-289.
- BJORNSDOTTIR, S., AGUSTSDOTTIR, E., BLOMSTROM, A. L., OSTROM, I. L., BERNDTSSON, L. T., SVANSSON, V., WENSMAN, J. J. (2013). Serological markers of Bornavirus infection found in horses in Iceland. *Acta Vet Scand* 55(1): 77.
- BOCK, P., ROHN, K., BEINEKE, A., BAUMGÄRTNER, W., WEWETZER, K. (2009). Site-specific population dynamics and variable olfactory marker protein expression in the postnatal canine olfactory epithelium. *J Anat* 215(5): 522-535.
- BODE, L., DÜRRWALD, R., LUDWIG, H. (1994). Borna virus infections in cattle associated with fatal neurological disease. *Vet Rec* 135(12): 283-284.
- BODE, L., KOMAROFF, A. L. and LUDWIG, H. (1992). No serologic evidence of borna disease virus in patients with chronic fatigue syndrome. *Clin Infect Dis* 15(6): 1049.
- BODE, L., ZIMMERMANN, W., FERSZT, R., STEINBACH, F., LUDWIG, H. (1995). Borna disease virus genome transcribed and expressed in psychiatric patients. *Nat Med* 1(3): 232-236.
- BOURG, M., HERZOG, S., ENCARNACAO, J. A., NOBACH, D., LANGE-HERBST, H., EICKMANN, M., HERDEN, C. (2013). Bicolored white-toothed shrews as reservoir for borna disease virus, Bavaria, Germany. *Emerg Infect Dis* 19(12): 2064-2066.
- BRAUCHI, S., CEA, C., FARIAS, J. G., BACIGALUPO, J., REYES, J. G. (2006). Apoptosis induced by prolonged exposure to odorants in cultured cells from rat olfactory epithelium. *Brain Res* 1103(1): 114-122.
- BRIESE, T., DE LA TORRE, J. C., LEWIS, A., LUDWIG, H., LIPKIN, W. I. (1992). Borna disease virus, a negative-strand RNA virus, transcribes in the nucleus of infected cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89(23): 11486-11489.
- BRIESE, T., HATALSKI, C. G., KLOCHE, S., PARK, Y. S., LIPKIN, W. I. (1995). Enzyme-linked immunosorbent assay for detecting antibodies to Borna disease virus-specific proteins. *J Clin Microbiol* 33(2): 348-351.
- BRIESE, T., SCHNEEMANN, A., LEWIS, A. J., PARK, Y. S., KIM, S., LUDWIG, H., LIPKIN, W. I. (1994). Genomic organization of Borna disease virus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91(10): 4362-4366.
- BROWN, J. P., COUILLARD-DESPRES, S., COOPER-KUHN, C. M., WINKLER, J., AIGNER, L., KUHN, H. G. (2003). Transient expression of doublecortin during adult neurogenesis. *J Comp Neurol* 467(1): 1-10.

- BROWN, R. C., LOCKWOOD, A. H., SONAWANE, B. R. (2005). Neurodegenerative diseases: an overview of environmental risk factors. *Environ Health Perspect* 113(9): 1250-1256.
- BUIAKOVA, O. I., BAKER, H., SCOTT, J. W., FARBMAN, A., KREAM, R., GRILLO, M., FRANZEN, L., RICHMAN, M., DAVIS, L. M., ABBONDANZO, S., STEWART, C. L., MARGOLIS, F. L. (1996). Olfactory marker protein (OMP) gene deletion causes altered physiological activity of olfactory sensory neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93(18): 9858-9863.
- BUIAKOVA, O. I., KRISHNA, N. S., GETCHELL, T. V., MARGOLIS, F. L. (1994). Human and rodent OMP genes: conservation of structural and regulatory motifs and cellular localization. *Genomics* 20(3): 452-462.
- BURRAGE, T. G., TIGNOR, G. H., SMITH, A. L. (1985). Rabies virus binding at neuromuscular junctions. *Virus Res* 2(3): 273-289.
- CALOF, A. L., BONNIN, A., CROCKER, C., KAWAUCHI, S., MURRAY, R. C., SHOU, J., WU, H. H. (2002). Progenitor cells of the olfactory receptor neuron lineage. *Microsc Res Tech* 58(3): 176-188.
- CALOF, A. L., CHIKARAISHI, D. M. (1989). Analysis of neurogenesis in a mammalian neuroepithelium: proliferation and differentiation of an olfactory neuron precursor in vitro. *Neuron* 3(1): 115-127.
- CAMARA, C. G., HARDING, J. W. (1984). Thymidine incorporation in the olfactory epithelium of mice: early exponential response induced by olfactory neurectomy. *Brain Res* 308(1): 63-68.
- CAMPBELL, G. L., MARFIN, A. A., LANCIOTTI, R. S., GUBLER, D. J. (2002). West Nile virus. *Lancet Infect Dis* 2(9): 519-529.
- CAPLAZI, P., EHRENSPERGER, F. (1998). Spontaneous Borna disease in sheep and horses: immunophenotyping of inflammatory cells and detection of MHC-I and MHC-II antigen expression in Borna encephalitis lesions. *Vet Immunol Immunopathol* 61(2-4): 203-220.
- CAPLAZI, P., WALDVOGEL, A., STITZ, L., BRAUN, U., EHRENSPERGER, F. (1994). Borna disease in naturally infected cattle. *J Comp Pathol* 111(1): 65-72.
- CARBONE, K. M., DUCHALA, C. S., GRIFFIN, J. W., KINCAID, A. L., NARAYAN, O. (1987). Pathogenesis of Borna disease in rats: evidence that intra-axonal spread is the major route for virus dissemination and the determinant for disease incubation. *J Virol* 61(11): 3431-3440.
- CARBONE, K. M., PARK, S. W., RUBIN, S. A., WALTRIP, R. W., 2ND, VOGELSANG, G. B. (1991). Borna disease: association with a maturation defect in the cellular immune response. *J Virol* 65(11): 6154-6164.
- CARBONE, K. M., RUBIN, S. A., SIERRA-HONIGMANN, A. M., LEDERMAN, H. M. (1993). Characterization of a glial cell line persistently infected with borna disease virus (BDV): influence of neurotrophic factors on BDV protein and RNA expression. *J Virol* 67(3): 1453-1460.
- CARR, V. M., FARBMAN, A. I., COLLETTI, L. M., MORGAN, J. I. (1991). Identification of a new non-neuronal cell type in rat olfactory epithelium. *Neuroscience* 45(2): 433-449.

- CARSON, C., MURDOCH, B., ROSKAMS, A. J. (2006). Notch 2 and Notch 1/3 segregate to neuronal and glial lineages of the developing olfactory epithelium. *Dev Dyn* 235(6): 1678-1688.
- CARTER, L. A., MACDONALD, J. L., ROSKAMS, A. J. (2004). Olfactory horizontal basal cells demonstrate a conserved multipotent progenitor phenotype. *J Neurosci* 24(25): 5670-5683.
- CASERTA, M. T., MOCK, D. J., DEWHURST, S. (2001). Human herpesvirus 6. *Clin Infect Dis* 33(6): 829-833.
- CELIS, J. E., MADSEN, P., CELIS, A., NIELSEN, H. V., GESSER, B. (1987). Cyclin (PCNA, auxiliary protein of DNA polymerase delta) is a central component of the pathway(s) leading to DNA replication and cell division. *FEBS Lett* 220(1): 1-7.
- CHALLONER, P. B., SMITH, K. T., PARKER, J. D., MACLEOD, D. L., COULTER, S. N., ROSE, T. M., SCHULTZ, E. R., BENNETT, J. L., GARBER, R. L., CHANG, M., ET AL. (1995). Plaque-associated expression of human herpesvirus 6 in multiple sclerosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92(16): 7440-7444.
- CHAPENKO, S., KRUMINA, A., KOZIREVA, S., NORA, Z., SULTANOVA, A., VIKSNA, L., MUROVSKA, M. (2006). Activation of human herpesviruses 6 and 7 in patients with chronic fatigue syndrome. *J Clin Virol* 37 Suppl 1: S47-51.
- CHASE, G., MAYER, D., HILDEBRAND, A., FRANK, R., HAYASHI, Y., TOMONAGA, K., SCHWEMMLE, M. (2007). Borna disease virus matrix protein is an integral component of the viral ribonucleoprotein complex that does not interfere with polymerase activity. *J Virol* 81(2): 743-749.
- CHEN, H., DADSETAN, S., FOMINA, A. F., GONG, Q. (2008). Expressing exogenous functional odorant receptors in cultured olfactory sensory neurons. *Neural Dev* 3: 22.
- CHEN, X., FANG, H., SCHWOB, J. E. (2004). Multipotency of purified, transplanted globose basal cells in olfactory epithelium. *J Comp Neurol* 469(4): 457-474.
- CHOI, J. H., LEE, C. H., YOO, K. Y., KWON, S. H., HER, S., SHIN, H. C., LEE, Y. L., HWANG, I. K., LEE, I. S., WON, M. H. (2010). Immunoreactivity and protein levels of olfactory marker protein and tyrosine hydroxylase are not changed in the dog main olfactory bulb during normal ageing. *J Comp Pathol* 142(2-3): 147-156.
- CHOMCZYNSKI, P., SACCHI, N. (1987). Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 162(1): 156-159.
- CHUAH, M. I., FARBMAN, A. I., MENCO, B. P. (1985). Influence of olfactory bulb on dendritic knob density of rat olfactory receptor neurons in vitro. *Brain Res* 338(2): 259-266.
- CLAY, C. C., RODRIGUES, D. S., HO, Y. S., FALLERT, B. A., JANATPOUR, K., REINHART, T. A., ESSER, U. (2007). Neuroinvasion of fluorescein-positive monocytes in acute simian immunodeficiency virus infection. *J Virol* 81(21): 12040-12048.
- CLEMENTE, R., DE LA TORRE, J. C. (2007). Cell-to-cell spread of Borna disease virus proceeds in the absence of the virus primary receptor and furin-mediated processing of the virus surface glycoprotein. *J Virol* 81(11): 5968-5977.

- CLEMENTE, R., DE LA TORRE, J. C. (2009). Cell entry of Borna disease virus follows a clathrin-mediated endocytosis pathway that requires Rab5 and microtubules. *J Virol* 83(20): 10406-10416.
- CLEMENTE, R., DE PARSEVAL, A., PEREZ, M., DE LA TORRE, J. C. (2009). Borna disease virus requires cholesterol in both cellular membrane and viral envelope for efficient cell entry. *J Virol* 83(6): 2655-2662.
- COMPANS, R. W., MELSEN, L. R., DE LA TORRE, J. C. (1994). Virus-like particles in MDCK cells persistently infected with Borna disease virus. *Virus Res* 33(3): 261-268.
- CONNOLLY, J. H., ALLEN, I. V., HURWITZ, L. J., MILLAR, J. H. (1967). Measles-virus antibody and antigen in subacute sclerosing panencephalitis. *Lancet* 1(7489): 542-544.
- CONOMY, J. P., LEIBOVITZ, A., MCCOMBS, W., STINSON, J. (1977). Airborne rabies encephalitis: demonstration of rabies virus in the human central nervous system. *Neurology* 27(1): 67-69.
- CONZELMANN, K. K. (1998). Nonsegmented negative-strand RNA viruses: genetics and manipulation of viral genomes. *Annu Rev Genet* 32: 123-162.
- CONZELMANN, K. K. (2004). Reverse genetics of mononegavirales. *Curr Top Microbiol Immunol* 283: 1-41.
- CORONA, C., PORCARIO, C., MARTUCCI, F., IULINI, B., MANEA, B., GALLO, M., PALMITESSA, C., MAURELLA, C., MAZZA, M., PEZZOLATO, M., ACUTIS, P., CASALONE, C. (2009). Olfactory system involvement in natural scrapie disease. *J Virol* 83(8): 3657-3667.
- COWLEY, T. J., WEISS, S. R. (2010). Murine coronavirus neuropathogenesis: determinants of virulence. *J Neurovirol* 16(6): 427-434.
- CUBITT, B., DE LA TORRE, J. C. (1994). Borna disease virus (BDV), a nonsegmented RNA virus, replicates in the nuclei of infected cells where infectious BDV ribonucleoproteins are present. *J Virol* 68(3): 1371-1381.
- CUBITT, B., LY, C. and DE LA TORRE, J. C. (2001). Identification and characterization of a new intron in Borna disease virus. *J Gen Virol* 82(Pt 3): 641-646.
- CUBITT, B., OLDSTONE, C., DE LA TORRE, J. C. (1994a). Sequence and genome organization of Borna disease virus. *J Virol* 68(3): 1382-1396.
- CUBITT, B., OLDSTONE, C., VALCARCEL, J., CARLOS DE LA TORRE, J. (1994b). RNA splicing contributes to the generation of mature mRNAs of Borna disease virus, a non-segmented negative strand RNA virus. *Virus Res* 34(1): 69-79.
- CURANOVIC, D., ENQUIST, L. (2009). Directional transneuronal spread of alpha-herpesvirus infection. *Future Virol* 4(6): 591.
- DAVIS, J. A., REED, R. R. (1996). Role of Olf-1 and Pax-6 transcription factors in neurodevelopment. *J Neurosci* 16(16): 5082-5094.
- DE LA TORRE, J. C. (1994). Molecular biology of borna disease virus: prototype of a new group of animal viruses. *J Virol* 68(12): 7669-7675.
- DE LA TORRE, J. C. (2002). Molecular biology of Borna disease virus and persistence. *Front Biosci* 7: d569-579.

- DE LA TORRE, J. C. (2006). Reverse-genetic approaches to the study of Borna disease virus. *Nat Rev Microbiol* 4(10): 777-783.
- DECKNER, M. L., FRISEN, J., VERGE, V. M., HOKFELT, T., RISLING, M. (1993). Localization of neurotrophin receptors in olfactory epithelium and bulb. *Neuroreport* 5(3): 301-304.
- DEGIORGIS, M. P., BERG, A. L., HARD AF SEGERSTAD, C., MORNER, T., JOHANSSON, M., BERG, M. (2000). Borna disease in a free-ranging lynx (*Lynx lynx*). *J Clin Microbiol* 38(8): 3087-3091.
- DELNATTE, P., BERKVEN, C., KUMMROW, M., SMITH, D. A., CAMPBELL, D., CRAWSHAW, G., OJKIC, D., DELAY, J. (2011). New genotype of avian bornavirus in wild geese and trumpeter swans in Canada. *Vet Rec* 169(4): 108.
- DESCHL, U., STITZ, L., HERZOG, S., FRESE, K., ROTT, R. (1990). Determination of immune cells and expression of major histocompatibility complex class II antigen in encephalitic lesions of experimental Borna disease. *Acta Neuropathol* 81(1): 41-50.
- DETJE, C. N., MEYER, T., SCHMIDT, H., KREUZ, D., ROSE, J. K., BECHMANN, I., PRINZ, M., KALINKE, U. (2009). Local type I IFN receptor signaling protects against virus spread within the central nervous system. *J Immunol* 182(4): 2297-2304.
- DHURIA, S. V., HANSON, L. R., FREY, W. H., 2ND (2010). Intranasal delivery to the central nervous system: mechanisms and experimental considerations. *J Pharm Sci* 99(4): 1654-1673.
- DIETZ, D., VOGEL, M., RUBIN, S., MORAN, T., CARBONE, K., PLETNIKOV, M. (2004). Developmental alterations in serotonergic neurotransmission in Borna disease virus (BDV)-infected rats: a multidisciplinary analysis. *J Neurovirol* 10(5): 267-277.
- DIETZ, D. M., PLETNIKOV, M. V. (2003). Postnatal weight gain inhibition does not account for neurobehavioral consequences of neonatal Borna disease virus infection. *Physiol Behav* 80(2-3): 359-366.
- DITTMAR, S., HARMS, H., RUNKLER, N., MAISNER, A., KIM, K. S., SCHNEIDER-SCHAULIES, J. (2008). Measles virus-induced block of transendothelial migration of T lymphocytes and infection-mediated virus spread across endothelial cell barriers. *J Virol* 82(22): 11273-11282.
- DORIG, R. E., MARCIL, A., CHOPRA, A., RICHARDSON, C. D. (1993). The human CD46 molecule is a receptor for measles virus (Edmonston strain). *Cell* 75(2): 295-305.
- DOTY, R. L. (2008). The olfactory vector hypothesis of neurodegenerative disease: is it viable? *Ann Neurol* 63(1): 7-15.
- DOTY, R. L. (2009). The olfactory system and its disorders. *Semin Neurol* 29(1): 74-81.
- DUCHALA, C. S., CARBONE, K. M., NARAYAN, O. (1989). Preliminary studies on the biology of Borna disease virus. *J Gen Virol* 70 (Pt 12): 3507-3511.
- DÜRRWALD, R. (1993). Die natürliche Borna Virus Infektion der Einhufer und Schafe Dissertation, Freie Universität Berlin, Fachbereich Veterinärmedizin, Dissertation.

- DÜRRWALD, R., KOLODZIEJEK, J., HERZOG, S., NOWOTNY, N. (2007). Meta-analysis of putative human bornavirus sequences fails to provide evidence implicating Borna disease virus in mental illness. *Rev Med Virol* 17(3): 181-203.
- DÜRRWALD, R., KOLODZIEJEK, J., MULUNEH, A., HERZOG, S., NOWOTNY, N. (2006). Epidemiological pattern of classical Borna disease and regional genetic clustering of Borna disease viruses point towards the existence of to-date unknown endemic reservoir host populations. *Microbes Infect* 8(3): 917-929.
- DÜRRWALD, R., KOLODZIEJEK, J., WEISSENBOECK, H., NOWOTNY, N. (2014). The Bicolored White-Toothed Shrew *Crocidura leucodon* (HERMANN 1780) Is an Indigenous Host of Mammalian Borna Disease Virus. *PLoS One* 9(4): e93659.
- DÜRRWALD, R., LUDWIG, H. (1997). Borna disease virus (BDV), a (zoonotic?) worldwide pathogen. A review of the history of the disease and the virus infection with comprehensive bibliography. *Zentralbl Veterinärmed B* 44(3): 147-184.
- EICKMANN, M., KIEMAYER, S., KRAUS, I., GOSSL, M., RICHT, J. A., GARTEN, W. (2005). Maturation of Borna disease virus glycoprotein. *FEBS Lett* 579(21): 4751-4756.
- EISENMAN, L. M., BROTHERS, R., TRAN, M. H., KEAN, R. B., DICKSON, G. M., DIETZSCHOLD, B., HOOPER, D. C. (1999). Neonatal Borna disease virus infection in the rat causes a loss of Purkinje cells in the cerebellum. *J Neurovirol* 5(2): 181-189.
- ENGELHARDT, K. R., RICHTER, K., BAUR, K., STAEHELI, P., HAUSMANN, J. (2005). The functional avidity of virus-specific CD8+ T cells is down-modulated in Borna disease virus-induced immunopathology of the central nervous system. *Eur J Immunol* 35(2): 487-497.
- ERNST, W., HAHN, H. (1927). Weitere Beiträge zur Bornaschen Krankheit der Pferde und zur Frage der Ätiologie des böartigen Katarrhalfiebers der Rinder. *Münch Tierärztl Wschr*(78): 85-89.
- ESIRI, M. M. (1982). Herpes simplex encephalitis. An immunohistological study of the distribution of viral antigen within the brain. *J Neurol Sci* 54(2): 209-226.
- ESSBAUER, S. S., KRAUTKRAMER, E., HERZOG, S., PFEFFER, M. (2011). A new permanent cell line derived from the bank vole (*Myodes glareolus*) as cell culture model for zoonotic viruses. *Virol J* 8: 339.
- FALANGOLA, M. F., HANLY, A., GALVAO-CASTRO, B., PETITO, C. K. (1995). HIV infection of human choroid plexus: a possible mechanism of viral entry into the CNS. *J Neuropathol Exp Neurol* 54(4): 497-503.
- FALANGOLA, M. F., PETITO, C. K. (1993). Choroid plexus infection in cerebral toxoplasmosis in AIDS patients. *Neurology* 43(10): 2035-2040.
- FAN, Q., AMEN, M., HARDEN, M., SEVERINI, A., GRIFFITHS, A., LONGNECKER, R. (2012). Herpes B virus utilizes human nectin-1 but not HVEM or PILRalpha for cell-cell fusion and virus entry. *J Virol* 86(8): 4468-4476.
- FARBMAN, A. I. (1990). Olfactory neurogenesis: genetic or environmental controls? *Trends Neurosci* 13(9): 362-365.
- FARBMAN, A. I., MARGOLIS, F. L. (1980). Olfactory marker protein during ontogeny: immunohistochemical localization. *Dev Biol* 74(1): 205-215.

- FERON, F., BIANCO, J., FERGUSON, I., MACKAY-SIM, A. (2008). Neurotrophin expression in the adult olfactory epithelium. *Brain Res* 1196: 13-21.
- FERON, F., MACKAY-SIM, A., ANDRIEU, J. L., MATTHAEI, K. I., HOLLEY, A., SICARD, G. (1999). Stress induces neurogenesis in non-neuronal cell cultures of adult olfactory epithelium. *Neuroscience* 88(2): 571-583.
- FLEXNER, S., AMOSS, H. L. (1920). Experiments on the Nasal Route of Infection in Poliomyelitis. *J Exp Med* 31(2): 123-134.
- FOTHERINGHAM, J., JACOBSON, S. (2005). Human herpesvirus 6 and multiple sclerosis: potential mechanisms for virus-induced disease. *Herpes* 12(1): 4-9.
- FREUDE, S., HAUSMANN, J., HOFER, M., PHAM-MITCHELL, N., CAMPBELL, I. L., STAEHELI, P., PAGENSTECHE, A. (2002). Borna disease virus accelerates inflammation and disease associated with transgenic expression of interleukin-12 in the central nervous system. *J Virol* 76(23): 12223-12232.
- FU, Z. F., AMSTERDAM, J. D., KAO, M., SHANKAR, V., KOPROWSKI, H., DIETZSCHOLD, B. (1993). Detection of Borna disease virus-reactive antibodies from patients with affective disorders by western immunoblot technique. *J Affect Disord* 27(1): 61-68.
- FUJINO, K., HORIE, M., HONDA, T., MERRIMAN, D. K., TOMONAGA, K. (2014). Inhibition of Borna disease virus replication by an endogenous bornavirus-like element in the ground squirrel genome. *Proc Natl Acad Sci U S A* 111(36): 13175-13180.
- FUJINO, K., HORIE, M., HONDA, T., NAKAMURA, S., MATSUMOTO, Y., FRANCISCHETTI, I. M., TOMONAGA, K. (2012). Evolutionarily conserved interaction between the phosphoproteins and X proteins of bornaviruses from different vertebrate species. *PLoS One* 7(12): e51161.
- FURRER, E., BILZER, T., STITZ, L., PLANZ, O. (2001). Neutralizing antibodies in persistent borna disease virus infection: prophylactic effect of gp94-specific monoclonal antibodies in preventing encephalitis. *J Virol* 75(2): 943-951.
- GALABRU, J., SARON, M. F., BERG, M., BERG, A. L., HERZOG, S., LABIE, J., ZIENTARA, S. (2000). Borna disease virus antibodies in French horses. *Vet Rec* 147(25): 721-722.
- GARCIA-SUAREZ, O., GERMANA, G., NAVES, F. J., CIRIACO, E., REPRESA, J., VEGA, J. A. (1997). Sensory epithelium of the vomeronasal organ express TrkA-like and epidermal growth factor receptor in adulthood. An immunohistochemical study in the horse. *Anat Rec* 247(3): 299-306.
- GAROFF, H., HEWSON, R., OPSTELTEN, D. J. (1998). Virus maturation by budding. *Microbiol Mol Biol Rev* 62(4): 1171-1190.
- GEIB, T., SAUDER, C., VENTURELLI, S., HASSLER, C., STAEHELI, P., SCHWEMMLE, M. (2003). Selective virus resistance conferred by expression of Borna disease virus nucleocapsid components. *J Virol* 77(7): 4283-4290.
- GEORGSSON, G. (1994). Neuropathologic aspects of lentiviral infections. *Ann N Y Acad Sci* 724: 50-67.
- GESSAIN, A., BARIN, F., VERNANT, J. C., GOUT, O., MAURS, L., CALENDER, A., DE THE, G. (1985). Antibodies to human T-lymphotropic virus type-I in patients with tropical spastic paraparesis. *Lancet* 2(8452): 407-410.

- GIZURARSON, S. (2012). Anatomical and histological factors affecting intranasal drug and vaccine delivery. *Curr Drug Deliv* 9(6): 566-582.
- GODFRAIND, C., HAVAUX, N., HOLMES, K. V., COUTELIER, J. P. (1997). Role of virus receptor-bearing endothelial cells of the blood-brain barrier in preventing the spread of mouse hepatitis virus-A59 into the central nervous system. *J Neurovirol* 3(6): 428-434.
- GODFRAIND, C., LANGRETH, S. G., CARDELLICCHIO, C. B., KNOBLER, R., COUTELIER, J. P., DUBOIS-DALCQ, M., HOLMES, K. V. (1995). Tissue and cellular distribution of an adhesion molecule in the carcinoembryonic antigen family that serves as a receptor for mouse hepatitis virus. *Lab Invest* 73(5): 615-627.
- GOETZE, B., BREER, H., STROTMANN, J. (2002). A long-term culture system for olfactory explants with intrinsically fluorescent cell populations. *Chem Senses* 27(9): 817-824.
- GOLDBLOOM, A., KEITH, H. M. (1937). Acute Encephalitis Following German Measles. *Can Med Assoc J* 36(2): 181.
- GOLDSTEIN, B. J., SCHWOB, J. E. (1996). Analysis of the globose basal cell compartment in rat olfactory epithelium using GBC-1, a new monoclonal antibody against globose basal cells. *J Neurosci* 16(12): 4005-4016.
- GONG, Q., LIU, W. L., SRODON, M., FOSTER, T. D., SHIPLEY, M. T. (1996). Olfactory epithelial organotypic slice cultures: a useful tool for investigating olfactory neural development. *Int J Dev Neurosci* 14(7-8): 841-852.
- GONZALEZ-DUNIA, D., CUBITT, B., DE LA TORRE, J. C. (1998). Mechanism of Borna disease virus entry into cells. *J Virol* 72(1): 783-788.
- GONZALEZ-DUNIA, D., CUBITT, B., GRASSER, F. A., DE LA TORRE, J. C. (1997a). Characterization of Borna disease virus p56 protein, a surface glycoprotein involved in virus entry. *J Virol* 71(4): 3208-3218.
- GONZALEZ-DUNIA, D., SAUDER, C., DE LA TORRE, J. C. (1997b). Borna disease virus and the brain. *Brain Res Bull* 44(6): 647-664.
- GONZALEZ-DUNIA, D., WATANABE, M., SYAN, S., MALLORY, M., MASLIAH, E., DE LA TORRE, J. C. (2000). Synaptic pathology in Borna disease virus persistent infection. *J Virol* 74(8): 3441-3448.
- GOSZTONYI, G., DIETZSCHOLD, B., KAO, M., RUPPRECHT, C. E., LUDWIG, H., KOPROWSKI, H. (1993). Rabies and borna disease. A comparative pathogenetic study of two neurovirulent agents. *Lab Invest* 68(3): 285-295.
- GRABNER, A., FISCHER, A. (1991). [Symptomatology and diagnosis of Borna encephalitis of horses. A case analysis of the last 13 years]. *Tierärztl Prax* 19(1): 68-73.
- GRABNER, A., HERZOG, S., LANGE-HERBST, H. (2002). Die intra-vitam-Diagnose der Bornaschen Krankheit (BD) bei Equiden. *Pferdeheilkunde* 18.
- GRAZIADEI, G. A., STANLEY, R. S., GRAZIADEI, P. P. (1980). The olfactory marker protein in the olfactory system of the mouse during development. *Neuroscience* 5(7): 1239-1252.
- GRAZIADEI, P. P., GRAZIADEI, G. A. (1979). Neurogenesis and neuron regeneration in the olfactory system of mammals. I. Morphological aspects of differentiation and structural organization of the olfactory sensory neurons. *J Neurocytol* 8(1): 1-18.

- GRAZIADEI, P. P., MONTI GRAZIADEI, A. G. (1983). Regeneration in the olfactory system of vertebrates. *Am J Otolaryngol* 4(4): 228-233.
- GRILL, R. J., PIXLEY, S. K. (1997). In vitro generation of adult rat olfactory sensory neurons and regulation of maturation by coculture with CNS tissues. *J Neurosci* 17(9): 3120-3127.
- HABJAN, M., ANDERSSON, I., KLINGSTROM, J., SCHUMANN, M., MARTIN, A., ZIMMERMANN, P., WAGNER, V., PICHLMAIR, A., SCHNEIDER, U., MUHLBERGER, E., MIRAZIMI, A., WEBER, F. (2008). Processing of genome 5' termini as a strategy of negative-strand RNA viruses to avoid RIG-I-dependent interferon induction. *PLoS One* 3(4): e2032.
- HAGIWARA, K., OKAMOTO, M., KAMITANI, W., TAKAMURA, S., TANIYAMA, H., TSUNODA, N., TANAKA, H., IWAI, H., IKUTA, K. (2002). Nosological study of Borna disease virus infection in race horses. *Vet Microbiol* 84(4): 367-374.
- HALLENSLEBEN, W., SCHWEMMLE, M., HAUSMANN, J., STITZ, L., VOLK, B., PAGENSTECHER, A., STAEHELI, P. (1998). Borna disease virus-induced neurological disorder in mice: infection of neonates results in immunopathology. *J Virol* 72(5): 4379-4386.
- HAMIR, A. N., KUNKLE, R. A., RICHT, J. A., MILLER, J. M., GREENLEE, J. J. (2008). Experimental transmission of US scrapie agent by nasal, peritoneal, and conjunctival routes to genetically susceptible sheep. *Vet Pathol* 45(1): 7-11.
- HANLY, A., PETITO, C. K. (1998). HLA-DR-positive dendritic cells of the normal human choroid plexus: a potential reservoir of HIV in the central nervous system. *Hum Pathol* 29(1): 88-93.
- HARBERTS, E., YAO, K., WOHLER, J. E., MARIC, D., OHAYON, J., HENKIN, R., JACOBSON, S. (2011). Human herpesvirus-6 entry into the central nervous system through the olfactory pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108(33): 13734-13739.
- HARTMAN, B. K., MARGOLIS, F. L. (1975). Immunofluorescence localization of the olfactory marker protein. *Brain Res* 96(1): 176-180.
- HATALSKI, C. G., HICKEY, W. F., LIPKIN, W. I. (1998a). Evolution of the immune response in the central nervous system following infection with Borna disease virus. *J Neuroimmunol* 90(2): 137-142.
- HATALSKI, C. G., HICKEY, W. F., LIPKIN, W. I. (1998b). Humoral immunity in the central nervous system of Lewis rats infected with Borna disease virus. *J Neuroimmunol* 90(2): 128-136.
- HATALSKI, C. G., KLICHE, S., STITZ, L., LIPKIN, W. I. (1995). Neutralizing antibodies in Borna disease virus-infected rats. *J Virol* 69(2): 741-747.
- HAUSMANN, J., HALLENSLEBEN, W., DE LA TORRE, J. C., PAGENSTECHER, A., ZIMMERMANN, C., PIRCHER, H., STAEHELI, P. (1999). T cell ignorance in mice to Borna disease virus can be overcome by peripheral expression of the viral nucleoprotein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96(17): 9769-9774.
- HAUSMANN, J., PAGENSTECHER, A., BAUR, K., RICHTER, K., RZIHA, H. J., STAEHELI, P. (2005). CD8 T cells require gamma interferon to clear borna disease virus from the brain and prevent immune system-mediated neuronal damage. *J Virol* 79(21): 13509-13518.
- HEINIG, A. (1969). Die Bornasche Krankheit bei Pferden und Schafen. *Handbuch der Virusinfektionen der Tiere*. Gustav Fischer Verlag, Jena, Röhrer H. (Hrsg): S.83-148.

- HEMPSTEAD, J. L., MORGAN, J. I. (1983). Monoclonal antibodies to the rat olfactory sustentacular cell. *Brain Res* 288(1-2): 289-295.
- HENRIKSSON, J., TJALVE, H. (2000). Manganese taken up into the CNS via the olfactory pathway in rats affects astrocytes. *Toxicol Sci* 55(2): 392-398.
- HERDEN, C. (1997). Immunzytochemische und histopathologische Untersuchungen zur biologischen Variabilität des Virus der Bornaschen Krankheit an intrazerebral infizierten Lewis-Ratten. Justus-Liebig-Universität Gießen, Fachbereich Veterinärmedizin, Dissertation.
- HERDEN, C. (1999). Comparison of different methods of diagnosing Borna disease in horses post mortem. *Equine infectious diseases VIII*. R. W. PUBLICATIONS. Newmarket, Wernery, U. Wade, J. Mumford, J.A. Kaaden O.R.
- HERDEN, C. (2009). Untersuchungen zu Pathogenese, Neurotropismus und Persistenz des Virus der Bornaschen Krankheit. Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover, Institut für Pathologie, Habilitationsschrift.
- HERDEN, C., BRIESE, T., LIPKIN, W. I., RICHT, J. A. (2013). Bornaviridae. In: *Fields Virology*. Knipe, D. M., Howley, P. M. (Hrsg.), Wolters Kluwer, Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia: 1124-1150.
- HERDEN, C., HERZOG, S., RICHT, J. A., NESSELER, A., CHRIST, M., FAILING, K., FRESE, K. (2000). Distribution of Borna disease virus in the brain of rats infected with an obesity-inducing virus strain. *Brain Pathol* 10(1): 39-48.
- HERDEN, C., SCHLUESENER, H. J., RICHT, J. A. (2005). Expression of allograft inflammatory factor-1 and haeme oxygenase-1 in brains of rats infected with the neurotropic Borna disease virus. *Neuropathol Appl Neurobiol* 31(5): 512-521.
- HERZOG, S., FRESE, K., ROTT, R. (1991). Studies on the genetic control of resistance of black hooded rats to Borna disease. *J Gen Virol* 72 (Pt 3): 535-540.
- HERZOG, S., FRESE, K., ROTT, R. (1994). Ein Beitrag zur Epizootiologie der Bornaschen Krankheit beim Pferd. *Wiener Tierärztliche Monatsschrift*(81): 374-379.
- HERZOG, S., KOMPTER, C., FRESE, K., ROTT, R. (1984). Replication of Borna disease virus in rats: age-dependent differences in tissue distribution. *Med Microbiol Immunol* 173(4): 171-177.
- HERZOG, S., PFEUFFER, I., HABERZETTL, K., FELDMANN, H., FRESE, K., BECHTER, K., RICHT, J. A. (1997). Molecular characterization of Borna disease virus from naturally infected animals and possible links to human disorders. *Arch Virol Suppl* 13: 183-190.
- HERZOG, S., ROTT, R. (1980). Replication of Borna disease virus in cell cultures. *Med Microbiol Immunol* 168(3): 153-158.
- HERZOG, S., WONIGEIT, K., FRESE, K., HEDRICH, H. J., ROTT, R. (1985). Effect of Borna disease virus infection on athymic rats. *J Gen Virol* 66 (Pt 3): 503-508.
- HIGGINS, R. J., KRAKOWKA, S. G., METZLER, A. E., KOESTNER, A. (1982). Experimental canine distemper encephalomyelitis in neonatal gnotobiotic dogs. A sequential ultrastructural study. *Acta Neuropathol* 57(4): 287-295.

- HILBE, M., HERRSCHE, R., KOLODZIEJEK, J., NOWOTNY, N., ZLINSZKY, K., EHRENSPERGER, F. (2006). Shrews as reservoir hosts of borna disease virus. *Emerg Infect Dis* 12(4): 675-677.
- HIRANO, N., KAO, M., LUDWIG, H. (1983). Persistent, tolerant or subacute infection in Borna disease virus-infected rats. *J Gen Virol* 64 (Pt 7): 1521-1530.
- HIRSCHBERGER, J. (1987). Herstellung und Charakterisierung monoklonaler Antikörper gegen T-Lymphozyten des Huhnes. Justus-Liebig-Universität Gießen, Fachbereich Veterinärmedizin, Dissertation.
- HOFER, M., HAUSMANN, J., STAEHELI, P., PAGENSTECHER, A. (2004). Cerebral expression of interleukin-12 induces neurological disease via differential pathways and recruits antigen-specific T cells in virus-infected mice. *Am J Pathol* 165(3): 949-958.
- HOFFMANN, B., TAPPE, D., HOPER, D., HERDEN, C., BOLDT, A., MAWRIN, C., NIEDERSTRASSER, O., MULLER, T., JENCKEL, M., VAN DER GRINTEN, E., LUTTER, C., ABENDROTH, B., TEIFKE, J. P., CADAR, D., SCHMIDT-CHANASIT, J., ULRICH, R. G., BEER, M. (2015). A Variegated Squirrel Bornavirus Associated with Fatal Human Encephalitis. *N Engl J Med* 373(2): 154-162.
- HOLBROOK, E. H., SZUMOWSKI, K. E., SCHWOB, J. E. (1995). An immunochemical, ultrastructural, and developmental characterization of the horizontal basal cells of rat olfactory epithelium. *J Comp Neurol* 363(1): 129-146.
- HOLBROOK, E. H., WU, E., CURRY, W. T., LIN, D. T., SCHWOB, J. E. (2011). Immunohistochemical characterization of human olfactory tissue. *Laryngoscope* 121(8): 1687-1701.
- HONKAVUORI, K. S., SHIVAPRASAD, H. L., WILLIAMS, B. L., QUAN, P. L., HORNIG, M., STREET, C., PALACIOS, G., HUTCHISON, S. K., FRANCA, M., EGHOLM, M., BRIESE, T., LIPKIN, W. I. (2008). Novel borna virus in psittacine birds with proventricular dilatation disease. *Emerg Infect Dis* 14(12): 1883-1886.
- HOPPE, S., GRAY, P. L., PAYNE, S., SHIVAPRASAD, H. L., TIZARD, I. (2010). The isolation, pathogenesis, diagnosis, transmission, and control of avian bornavirus and proventricular dilatation disease. *Vet Clin North Am Exot Anim Pract* 13(3): 495-508.
- HORIE, M., HONDA, T., SUZUKI, Y., KOBAYASHI, Y., DAITO, T., OSHIDA, T., IKUTA, K., JERN, P., GOJOBORI, T., COFFIN, J. M. and TOMONAGA, K. (2010). Endogenous non-retroviral RNA virus elements in mammalian genomes. *Nature* 463(7277): 84-87.
- HORIKAMI, S. M., CURRAN, J., KOLAKOFSKY, D., MOYER, S. A. (1992). Complexes of Sendai virus NP-P and P-L proteins are required for defective interfering particle genome replication in vitro. *J Virol* 66(8): 4901-4908.
- HORNIG, M., BRIESE, T., LICINIO, J., KHABBAZ, R. F., ALTSHULER, L. L., POTKIN, S. G., SCHWEMMLE, M., SIEMETZKI, U., MINTZ, J., HONKAVUORI, K., KRAEMER, H. C., EGAN, M. F., WHYBROW, P. C., BUNNEY, W. E., LIPKIN, W. I. (2012). Absence of evidence for bornavirus infection in schizophrenia, bipolar disorder and major depressive disorder. *Mol Psychiatry* 17(5): 486-493.
- HORNIG, M., BRIESE, T., LIPKIN, W. I. (2001). Bornavirus tropism and targeted pathogenesis: virus-host interactions in a neurodevelopmental model. *Adv Virus Res* 56: 557-582.

- HORNIG, M., WEISSENBOCK, H., HORSCROFT, N., LIPKIN, W. I. (1999). An infection-based model of neurodevelopmental damage. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96(21): 12102-12107.
- HSU, S. M., RAINE, L., FANGER, H. (1981). Use of avidin-biotin-peroxidase complex (ABC) in immunoperoxidase techniques: a comparison between ABC and unlabeled antibody (PAP) procedures. *J Histochem Cytochem* 29(4): 577-580.
- HUISINGA, M. (2008). Immunhistologische Untersuchung zur MHC II-Expression bei Dermatitiden von Hunden und Katzen. Justus-Liebig-Universität Gießen, Fachbereich Veterinärmedizin, Dissertation.
- HUNEYCUTT, B. S., BI, Z., AOKI, C. J., REISS, C. S. (1993). Central neuropathogenesis of vesicular stomatitis virus infection of immunodeficient mice. *J Virol* 67(11): 6698-6706.
- ICTV (2012). *Virus Taxonomy: Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*, Elsevier.
- IHLENBURG, H. (1962). Experimentelle Prüfung der Empfänglichkeit der Ziege für das Virus der Bornaschen Krankheit. *Mh. Vet. Med*(8): 337-341.
- IMBSCHWEILER, I., SEEHUSEN, F., PECK, C. T., OMAR, M., BAUMGÄRTNER, W., WEWETZER, K. (2012). Increased p75 neurotrophin receptor expression in the canine distemper virus model of multiple sclerosis identifies aldynoglia Schwann cells that emerge in response to axonal damage. *Glia* 60(3): 358-371.
- JACOBSEN, B., ALGERMISSEN, D., SCHAUDIEN, D., VENNEN, M., HERZOG, S., WENTZ, E., HEWICKER-TRAUTWEIN, M., BAUMGÄRTNER, W., HERDEN, C. (2010). Borna disease in an adult alpaca stallion (*Lama pacos*). *J Comp Pathol* 143(2-3): 203-208.
- JOEST, E. K., DEGEN, K. (1909). Über eigentümliche intranukleäre Einschlüsse bei der enzootischen Gehirn- und Rückenmarksentzündung. *Zeitschr Inf Krkh Haustiere*(6): 348-356.
- JOEST, E. K., DEGEN, K. (1911). Untersuchungen über die pathologische Histologie, Pathogenese und postmortale Diagnose der seuchenhaften Gehirnrückenmarksentzündung (BK) des Pferdes. *Zeitschr Inf Krkh Haustiere*(9): 1-98.
- KAMHIEH, S., FLOWER, R. L. (2006). Borna Disease Virus (BDV) infection in cats a concise review based on current knowledge. *Vet Q* 28(2): 65-73.
- KAMHIEH, S., HODGSON, J., BODE, L., LUDWIG, H., WARD, C., FLOWER, R. L. (2006). No evidence of endemic Borna disease virus infection in Australian horses in contrast with endemic infection in other continents. *Arch Virol* 151(4): 709-719.
- KAMHIEH, S., HODGSON, J. L., BODE, L., LUDWIG, H., FLOWER, R. L. (2008). Borna disease virus: evidence of naturally-occurring infection in cats in Australia. *APMIS Suppl*(124): 50-52.
- KANAKI, K., KAWASHIMA, S., KASHIWAYANAGI, M., KURIHARA, K. (1997). Carnosine-induced inward currents in rat olfactory bulb neurons in cultured slices. *Neurosci Lett* 231(3): 167-170.
- KANAKI, K., SATO, K., KASHIWAYANAGI, M. (2000). Functional synapse formation between rat olfactory receptor neurons and olfactory bulb neurons in vitro. *Neurosci Lett* 285(1): 76-78.

- KAO, M., HAMIR, A. N., RUPPRECHT, C. E., FU, Z. F., SHANKAR, V., KOPROWSKI, H., DIETZSCHOLD, B. (1993). Detection of antibodies against Borna disease virus in sera and cerebrospinal fluid of horses in the USA. *Vet Rec* 132(10): 241-244.
- KAO, M., LUDWIG, H., GOSZTONYI, G. (1984). Adaptation of Borna disease virus to the mouse. *J Gen Virol* 65 (Pt 10): 1845-1849.
- KATZ, J. B., ALSTAD, D., JENNY, A. L., CARBONE, K. M., RUBIN, S. A., WALTRIP, R. W., 2ND (1998). Clinical, serologic, and histopathologic characterization of experimental Borna disease in ponies. *J Vet Diagn Invest* 10(4): 338-343.
- KAVOI, B., MAKANYA, A., HASSANALI, J., CARLSSON, H. E., KIAMA, S. (2010). Comparative functional structure of the olfactory mucosa in the domestic dog and sheep. *Ann Anat* 192(5): 329-337.
- KEHR, K. (2015). Ausbreitungs- und Persistenzstrategien des Virus der Bornaschen Krankheit in primären corticalen Astrozytenkulturen von Lewis Ratten. Justus-Liebig-Universität Gießen, Fachbereich Veterinärmedizin, Dissertation (eingereicht).
- KELLER, A., MARGOLIS, F. L. (1975). Immunological studies of the rat olfactory marker protein. *J Neurochem* 24(6): 1101-1106.
- KIERMAYER, S. (2002). Charakterisierung des Glykoproteins des Virus der Bornaschen Krankheit. Philipps-Universität Marburg, Fachbereich Biologie, Dissertation.
- KIERMAYER, S., KRAUS, I., RICHT, J. A., GARTEN, W., EICKMANN, M. (2002). Identification of the amino terminal subunit of the glycoprotein of Borna disease virus. *FEBS Lett* 531(2): 255-258.
- KINNUNEN, P. M., BILLICH, C., EK-KOMMONEN, C., HENTTONEN, H., KALLIO, R. K., NIEMIMAA, J., PALVA, A., STAEHELI, P., VAHERI, A., VAPALAHTI, O. (2007). Serological evidence for Borna disease virus infection in humans, wild rodents and other vertebrates in Finland. *J Clin Virol* 38(1): 64-69.
- KIRK, J., ZHOU, A. L., MCQUAID, S., COSBY, S. L., ALLEN, I. V. (1991). Cerebral endothelial cell infection by measles virus in subacute sclerosing panencephalitis: ultrastructural and in situ hybridization evidence. *Neuropathol Appl Neurobiol* 17(4): 289-297.
- KISTLER, A. L., GANCZ, A., CLUBB, S., SKEWES-COX, P., FISCHER, K., SORBER, K., CHIU, C. Y., LUBLIN, A., MECHANI, S., FARNOUSHI, Y., GRENINGER, A., WEN, C. C., KARLENE, S. B., GANEM, D., DERISI, J. L. (2008). Recovery of divergent avian bornaviruses from cases of proventricular dilatation disease: identification of a candidate etiologic agent. *Virol J* 5: 88.
- KLICHE, S., BRIESE, T., HENSCHEN, A. H., STITZ, L., LIPKIN, W. I. (1994). Characterization of a Borna disease virus glycoprotein, gp18. *J Virol* 68(11): 6918-6923.
- KOBAYASHI, T., KAMITANI, W., ZHANG, G., WATANABE, M., TOMONAGA, K., IKUTA, K. (2001). Borna disease virus nucleoprotein requires both nuclear localization and export activities for viral nucleocytoplasmic shuttling. *J Virol* 75(7): 3404-3412.
- KOBAYASHI, T., SHOYA, Y., KODA, T., TAKASHIMA, I., LAI, P. K., IKUTA, K., KAKINUMA, M., KISHI, M. (1998). Nuclear targeting activity associated with the amino terminal region of the Borna disease virus nucleoprotein. *Virology* 243(1): 188-197.

- KOBAYASHI, T., WATANABE, M., KAMITANI, W., TOMONAGA, K., IKUTA, K. (2000). Translation initiation of a bicistronic mRNA of Borna disease virus: a 16-kDa phosphoprotein is initiated at an internal start codon. *Virology* 277(2): 296-305.
- KOBAYASHI, T., ZHANG, G., LEE, B. J., BABA, S., YAMASHITA, M., KAMITANI, W., YANAI, H., TOMONAGA, K., IKUTA, K. (2003). Modulation of Borna disease virus phosphoprotein nuclear localization by the viral protein X encoded in the overlapping open reading frame. *J Virol* 77(14): 8099-8107.
- KOHNO, T., GOTO, T., TAKASAKI, T., MORITA, C., NAKAYA, T., IKUTA, K., KURANE, I., SANO, K., NAKAI, M. (1999). Fine structure and morphogenesis of Borna disease virus. *J Virol* 73(1): 760-766.
- KOŁODZIEJEK, J., DÜRRWALD, R., HERZOG, S., EHRENSPERGER, F., LUSSY, H., NOWOTNY, N. (2005). Genetic clustering of Borna disease virus natural animal isolates, laboratory and vaccine strains strongly reflects their regional geographical origin. *J Gen Virol* 86(Pt 2): 385-398.
- KOO, J. H., GILL, S., PANNELL, L. K., MENCIO, B. P., MARGOLIS, J. W., MARGOLIS, F. L. (2004). The interaction of Bex and OMP reveals a dimer of OMP with a short half-life. *J Neurochem* 90(1): 102-116.
- KRAKOWKA, S. (1989). Canine distemper virus infectivity of various blood fractions for central nervous system vasculature. *J Neuroimmunol* 21(1): 75-80.
- KRAKOWKA, S., CORK, L. C., WINKELSTEIN, J. A., AXTHELM, M. K. (1987). Establishment of central nervous system infection by canine distemper virus: breach of the blood-brain barrier and facilitation by antiviral antibody. *Vet Immunol Immunopathol* 17(1-4): 471-482.
- KRAMER, K., SCHAUDIEN, D., EISEL, U. L., HERZOG, S., RICHT, J. A., BAUMGÄRTNER, W., HERDEN, C. (2012). TNF-overexpression in Borna disease virus-infected mouse brains triggers inflammatory reaction and epileptic seizures. *PLoS One* 7(7): e41476.
- KRAUS, I., BOGNER, E., LILIE, H., EICKMANN, M. and GARTEN, W. (2005). Oligomerization and assembly of the matrix protein of Borna disease virus. *FEBS Lett* 579(12): 2686-2692.
- KRAUS, I., EICKMANN, M., KIERMAYER, S., SCHEFFCZIK, H., FLUESS, M., RICHT, J. A., GARTEN, W. (2001). Open reading frame III of borna disease virus encodes a nonglycosylated matrix protein. *J Virol* 75(24): 12098-12104.
- KRISHNA, N. S., LITTLE, S. S., GETCHELL, T. V. (1996). Epidermal growth factor receptor mRNA and protein are expressed in progenitor cells of the olfactory epithelium. *J Comp Neurol* 373(2): 297-307.
- KUHN, J. H., DÜRRWALD, R., BAO, Y., BRIESE, T., CARBONE, K., CLAWSON, A. N., DERISI, J. L., GARTEN, W., JAHRLING, P. B., KOŁODZIEJEK, J., RUBBENSTROTH, D., SCHWEMMLE, M., STENGLEIN, M., TOMONAGA, K., WEISSENBOCK, H., NOWOTNY, N. (2015). Taxonomic reorganization of the family Bornaviridae. *Arch Virol* 160(2): 621-632.
- KUMAR, P., TIMONEY, J. F., SOUTHGATE, H. H., SHEORAN, A. S. (2000). Light and scanning electron microscopic studies of the nasal turbinates of the horse. *Anat Histol Embryol* 29(2): 103-109.

- LAFAY, F., COULON, P., ASTIC, L., SAUCIER, D., RICHE, D., HOLLEY, A., FLAMAND, A. (1991). Spread of the CVS strain of rabies virus and of the avirulent mutant AvO1 along the olfactory pathways of the mouse after intranasal inoculation. *Virology* 183(1): 320-330.
- LANCASTER, K., DIETZ, D. M., MORAN, T. H., PLETNIKOV, M. V. (2007). Abnormal social behaviors in young and adult rats neonatally infected with Borna disease virus. *Behav Brain Res* 176(1): 141-148.
- LANGE, H., HERZOG, S., HERBST, W., SCHLIESSER, T. (1987). Seroepidemiologische Untersuchungen zur Bornaschen Krankheit (Ansteckende Gehirn-Rückenmarkentzündung) der Pferde. *Tierärztl. Umschau*(42): 938-946.
- LEBELT, J., HAGENAU, K. (1996). Distribution of Borna disease virus in naturally infected animals with clinical disease. *Berl Münch Tierärztl Wochenschr* 109(5): 178-183.
- LEIBOVITCH, E. C., JACOBSON, S. (2014). Evidence linking HHV-6 with multiple sclerosis: an update. *Curr Opin Virol* 9: 127-133.
- LENNARTZ, F., BAYER, K., CZERWONKA, N., LU, Y., KEHR, K., HIRZ, M., STEINMETZER, T., GARTEN, W., HERDEN, C. (2015). Surface glycoprotein of Borna Disease virus mediates virus spread from cell to cell. *Cell Microbiol*.
- LEON-MONZON, M. E., ILLA, I., DALAKAS, M. C. (1995). Expression of poliovirus receptor in human spinal cord and muscle. *Ann N Y Acad Sci* 753: 48-57.
- LI, J. M., LEI, D., PENG, F., ZENG, Y. J., LI, L., XIA, Z. L., XIA, X. Q., ZHOU, D. (2011). Detection of human herpes virus 6B in patients with mesial temporal lobe epilepsy in West China and the possible association with elevated NF-kappaB expression. *Epilepsy Res* 94(1-2): 1-9.
- LIEB, K., STAEHELI, P. (2001). Borna disease virus--does it infect humans and cause psychiatric disorders? *J Clin Virol* 21(2): 119-127.
- LIERZ, M., HERDEN, C., HERZOG, S., PIEPENBRING, A. (2010). Proventricular dilatation disease and Avian Bornavirus as a possible cause. *Tierärztl Prax Ausg K Kleintiere Heimtiere* 38(2): 87-94.
- LIST, J., HAASE, A. T. (1997). Integration of visna virus DNA occurs and may be necessary for productive infection. *Virology* 237(2): 189-197.
- LUDLOW, M., ALLEN, I., SCHNEIDER-SCHAULIES, J. (2009). Systemic spread of measles virus: overcoming the epithelial and endothelial barriers. *Thromb Haemost* 102(6): 1050-1056.
- LUDWIG, H., KRAFT, W., KAO, M., GOSZTONYI, G., DAHME, E., KREY, H. (1985). Borna virus infection (Borna disease) in naturally and experimentally infected animals: its significance for research and practice. *Tierärztl Prax* 13(4): 421-453.
- LUNDGREN, A. L., CZECH, G., BODE, L., LUDWIG, H. (1993). Natural Borna disease in domestic animals others than horses and sheep. *Zentralbl Veterinarmed B* 40(4): 298-303.
- LUNDGREN, A. L., ZIMMERMANN, W., BODE, L., CZECH, G., GOSZTONYI, G., LINDBERG, R., LUDWIG, H. (1995). Staggering disease in cats: isolation and characterization of the feline Borna disease virus. *J Gen Virol* 76 (Pt 9): 2215-2222.

- MACKAY-SIM, A., KITTEL, P. (1991). Cell dynamics in the adult mouse olfactory epithelium: a quantitative autoradiographic study. *J Neurosci* 11(4): 979-984.
- MARKOPOULOS, F., NEUBAUER, F. B., BERGER, T., SCOTTI, A. L. (2008). Reassembling a system from the sensor to cerebral representation: the olfactory system in vitro. *Neuroscience* 156(4): 1048-1063.
- MARSHALL, K. R., FIELD, H. J. (1997). Demonstration of equine herpesvirus-1 neuronal latency in murine olfactory bulbs using a novel combined in situ PCR and protein synthesis method. *Virology* 229(1): 279-282.
- MARTIN, K., HELENIUS, A. (1991). Nuclear transport of influenza virus ribonucleoproteins: the viral matrix protein (M1) promotes export and inhibits import. *Cell* 67(1): 117-130.
- MATSUMOTO, Y., HAYASHI, Y., OMORI, H., HONDA, T., DAITO, T., HORIE, M., IKUTA, K., FUJINO, K., NAKAMURA, S., SCHNEIDER, U., CHASE, G., YOSHIMORI, T., SCHWEMMLE, M., TOMONAGA, K. (2012). Bornavirus closely associates and segregates with host chromosomes to ensure persistent intranuclear infection. *Cell Host Microbe* 11(5): 492-503.
- MAYR, A., DANNER, K. (1974). Persistent infections caused by Borna virus. *Infection* 2(2): 64-69.
- MCGAVERN, D. B., KANG, S. S. (2011). Illuminating viral infections in the nervous system. *Nat Rev Immunol* 11(5): 318-329.
- MEEKER, R. B., BRAGG, D. C., POULTON, W., HUDSON, L. (2012). Transmigration of macrophages across the choroid plexus epithelium in response to the feline immunodeficiency virus. *Cell Tissue Res* 347(2): 443-455.
- METZLER, A., EHRENSPERGER, F., DANNER, K. (1979). Bornavirus-Infektionen bei Schafen: Verlaufsuntersuchungen nach spontaner Infektion, unter besonderer Berücksichtigung der Antikörperkinetik im Serum und Liquor cerebrospinalis. *Schweizer Archiv für Tierheilkunde*(121): 37-48.
- METZLER, A., EHRENSPERGER, F., WYLER, R. (1978). Natural borna virus infection in rabbits. *Zentralbl Veterinärmed B* 25(2): 161-164.
- METZLER, A., FREI, U., DANNER, K. (1976). Virologically confirmed outbreak of Borna's disease in a Swiss herd of sheep. *Schweiz Arch Tierheilkd* 118(11): 483-492.
- MILLER, M. A., KOTTLER, S. J., RAMOS-VARA, J. A., JOHNSON, P. J., GANJAM, V. K., EVANS, T. J. (2003). 3-methylindole induces transient olfactory mucosal injury in ponies. *Vet Pathol* 40(4): 363-370.
- MIURA, T. A., TRAVANTY, E. A., OKO, L., BIELEFELDT-OHMANN, H., WEISS, S. R., BEAUCHEMIN, N., HOLMES, K. V. (2008). The spike glycoprotein of murine coronavirus MHV-JHM mediates receptor-independent infection and spread in the central nervous systems of Ceacam1a^{-/-} Mice. *J Virol* 82(2): 755-763.
- MORALES, J. A., HERZOG, S., KOMPTER, C., FRESE, K., ROTT, R. (1988). Axonal transport of Borna disease virus along olfactory pathways in spontaneously and experimentally infected rats. *Med Microbiol Immunol* 177(2): 51-68.

- MORI, I., GOSHIMA, F., ITO, H., KOIDE, N., YOSHIDA, T., YOKOCHI, T., KIMURA, Y., NISHIYAMA, Y. (2005a). The vomeronasal chemosensory system as a route of neuroinvasion by herpes simplex virus. *Virology* 334(1): 51-58.
- MORI, I., NISHIYAMA, Y., YOKOCHI, T., KIMURA, Y. (2005b). Olfactory transmission of neurotropic viruses. *J Neurovirol* 11(2): 129-137.
- MORIMOTO, K., HOOPER, D. C., BORNHORST, A., CORISDEO, S., BETTE, M., FU, Z. F., SCHAFER, M. K., KOPROWSKI, H., WEIHE, E., DIETZSCHOLD, B. (1996). Intrinsic responses to Borna disease virus infection of the central nervous system. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93(23): 13345-13350.
- MORRISON, E. E., COSTANZO, R. M. (1992). Morphology of olfactory epithelium in humans and other vertebrates. *Microsc Res Tech* 23(1): 49-61.
- MÜHLEBACH, M. D., MATEO, M., SINN, P. L., PRUFER, S., UHLIG, K. M., LEONARD, V. H., NAVARATNARAJAH, C. K., FRENZKE, M., WONG, X. X., SAWATSKY, B., RAMACHANDRAN, S., MCCRAY, P. B., JR., CICHUTEK, K., VON MESSLING, V., LOPEZ, M., CATTANEO, R. (2011). Adherens junction protein nectin-4 is the epithelial receptor for measles virus. *Nature* 480(7378): 530-533.
- MULDER, W. A., JACOBS, L., PRIEM, J., KOK, G. L., WAGENAAR, F., KIMMAN, T. G., POL, J. M. (1994). Glycoprotein gE-negative pseudorabies virus has a reduced capability to infect second- and third-order neurons of the olfactory and trigeminal routes in the porcine central nervous system. *J Gen Virol* 75 (Pt 11): 3095-3106.
- MÜLLER-DOBLIES, D., BAUMANN, S., GROB, P., HULSMIEIER, A., MÜLLER-DOBLIES, U., BRUNKER, P., EHRENSPERGER, F., STAEHELI, P., ACKERMANN, M., SUTER, M. (2004). The humoral and cellular immune response of sheep against Borna disease virus in endemic and non-endemic areas. *Schweiz Arch Tierheilkd* 146(4): 159-172.
- MURDOCH, B., ROSKAMS, A. J. (2007). Olfactory epithelium progenitors: insights from transgenic mice and in vitro biology. *J Mol Histol* 38(6): 581-599.
- NAGATA, N., IWASAKI, T., AMI, Y., SATO, Y., HATANO, I., HARASHIMA, A., SUZAKI, Y., YOSHII, T., HASHIKAWA, T., SATA, T., HORIUCHI, Y., KOIKE, S., KURATA, T., NOMOTO, A. (2004). A poliomyelitis model through mucosal infection in transgenic mice bearing human poliovirus receptor, TgPVR21. *Virology* 321(1): 87-100.
- NANICHE, D., VARIOR-KRISHNAN, G., CERVONI, F., WILD, T. F., ROSSI, B., RABOURDIN-COMBE, C., GERLIER, D. (1993). Human membrane cofactor protein (CD46) acts as a cellular receptor for measles virus. *J Virol* 67(10): 6025-6032.
- NARAYAN, O., GRIFFIN, D. E., SILVERSTEIN, A. M. (1977). Slow virus infection: replication and mechanisms of persistence of visna virus in sheep. *J Infect Dis* 135(5): 800-806.
- NARAYAN, O., HERZOG, S., FRESE, K., SCHEEFERS, H., ROTT, R. (1983a). Behavioral disease in rats caused by immunopathological responses to persistent borna virus in the brain. *Science* 220(4604): 1401-1403.
- NARAYAN, O., HERZOG, S., FRESE, K., SCHEEFERS, H., ROTT, R. (1983b). Pathogenesis of Borna disease in rats: immune-mediated viral ophthalmoenkephalopathy causing blindness and behavioral abnormalities. *J Infect Dis* 148(2): 305-315.

- NARITA, M., IMADA, T., HARITANI, M. (1991). Immunohistological demonstration of spread of Aujeszky's disease virus via the olfactory pathway in HPCD pigs. *J Comp Pathol* 105(2): 141-145.
- NICKEL, R., SCHUMMER, A., SEIFERLE, E. (2004). *Lehrbuch der Anatomie der Haussäugetiere*. Band IV, Böhme G. (Hrsg.), Parey, Stuttgart.
- NIIMURA, Y. (2009). Evolutionary dynamics of olfactory receptor genes in chordates: interaction between environments and genomic contents. *Hum Genomics* 4(2): 107-118.
- NOBACH, D., BOURG, M., HERZOG, S., LANGE-HERBST, H., ENCARNACAO, J. A., EICKMANN, M., HERDEN, C. (2015). Shedding of Infectious Borna Disease Virus-1 in Living Bicolored White-Toothed Shrews. *PLoS One* 10(8): e0137018.
- NOSKE, K., BILZER, T., PLANZ, O., STITZ, L. (1998). Virus-specific CD4+ T cells eliminate borna disease virus from the brain via induction of cytotoxic CD8+ T cells. *J Virol* 72(5): 4387-4395.
- NOWOTNY, N., WEISSENBOCK, H. (1995). Description of feline nonsuppurative meningoencephalomyelitis (staggering disease) and studies of its etiology. *J Clin Microbiol* 33(6): 1668-1669.
- NOYCE, R. S., BONDRE, D. G., HA, M. N., LIN, L. T., SISSON, G., TSAO, M. S. RICHARDSON, C. D. (2011). Tumor cell marker PVRL4 (nectin 4) is an epithelial cell receptor for measles virus. *PLoS Pathog* 7(8): e1002240.
- NÜBLING, M., LÖWER, J., KURTH, R. und die Arbeitsgruppe Bornavirus (1999). Ringversuche zu PCR bzw. serologischen Methoden für den Nachweis von Bornavirus. Abstract. Jahrestagung der Gesellschaft für Virologie, Bremen.
- OBERDORSTER, G., SHARP, Z., ATUDOREI, V., ELDER, A., GELEIN, R., KREYLING, W., COX, C. (2004). Translocation of inhaled ultrafine particles to the brain. *Inhal Toxicol* 16(6-7): 437-445.
- OGAWA, T., TAKEZAWA, K., SHIMIZU, S., SHIMIZU, T. (2014). Valproic acid promotes neural regeneration of olfactory epithelium in adult mice after methimazole-induced damage. *Am J Rhinol Allergy* 28(2): e95-99.
- OHKA, S., MATSUDA, N., TOHYAMA, K., ODA, T., MORIKAWA, M., KUGE, S., NOMOTO, A. (2004). Receptor (CD155)-dependent endocytosis of poliovirus and retrograde axonal transport of the endosome. *J Virol* 78(13): 7186-7198.
- OHTA, Y., ICHIMURA, K. (2001). Globosal basal cells are identified as proliferating cells in mouse olfactory epithelium. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 110(1): 53-55.
- OMAR, M., HANSMANN, F., KREUTZER, R., KREUTZER, M., BRANDES, G., WEWETZER, K. (2013). Cell type- and isotype-specific expression and regulation of beta-tubulins in primary olfactory ensheathing cells and Schwann cells in vitro. *Neurochem Res* 38(5): 981-988.
- OTTA, J., JENTZSCH, K.-D. (1960). Spontane Infektion mit dem Virus der Bornaschen Krankheit bei Kaninchen. *Mh Vet Med*(15): 127-129.
- PATEL, R. M., PINTO, J. M. (2014). Olfaction: anatomy, physiology, and disease. *Clin Anat* 27(1): 54-60.

- PEREZ, M., SANCHEZ, A., CUBITT, B., ROSARIO, D., DE LA TORRE, J. C. (2003). A reverse genetics system for Borna disease virus. *J Gen Virol* 84(Pt 11): 3099-3104.
- PEREZ, M., WATANABE, M., WHITT, M. A., DE LA TORRE, J. C. (2001). N-terminal domain of Borna disease virus G (p56) protein is sufficient for virus receptor recognition and cell entry. *J Virol* 75(15): 7078-7085.
- PERLMAN, S., JACOBSEN, G., AFIFI, A. (1989). Spread of a neurotropic murine coronavirus into the CNS via the trigeminal and olfactory nerves. *Virology* 170(2): 556-560.
- PHILLIPS, J. M., WEISS, S. R. (2011). Pathogenesis of neurotropic murine coronavirus is multifactorial. *Trends Pharmacol Sci* 32(1): 2-7.
- PIEPENBRING, A. K., ENDERLEIN, D., HERZOG, S., KALETA, E. F., HEFFELS-REDMANN, U., RESSMEYER, S., HERDEN, C., LIERZ, M. (2012). Pathogenesis of avian bornavirus in experimentally infected cockatiels. *Emerg Infect Dis* 18(2): 234-241.
- PIXLEY, S. K. (1992). CNS glial cells support in vitro survival, division, and differentiation of dissociated olfactory neuronal progenitor cells. *Neuron* 8(6): 1191-1204.
- PIXLEY, S. K. (1996). Characterization of olfactory receptor neurons and other cell types in dissociated rat olfactory cell cultures. *Int J Dev Neurosci* 14(7-8): 823-839.
- PIXLEY, S. K., PUN, R. Y. (1990). Cultured rat olfactory neurons are excitable and respond to odors. *Brain Res Dev Brain Res* 53(1): 125-130.
- PLANZ, O., BILZER, T., SOBBE, M., STITZ, L. (1993). Lysis of major histocompatibility complex class I-bearing cells in Borna disease virus-induced degenerative encephalopathy. *J Exp Med* 178(1): 163-174.
- PLANZ, O., BILZER, T., STITZ, L. (1995). Immunopathogenic role of T-cell subsets in Borna disease virus-induced progressive encephalitis. *J Virol* 69(2): 896-903.
- PLANZ, O., RENTZSCH, C., BATRA, A., WINKLER, T., BUTTNER, M., RZIHA, H. J., STITZ, L. (1999). Pathogenesis of borna disease virus: granulocyte fractions of psychiatric patients harbor infectious virus in the absence of antiviral antibodies. *J Virol* 73(8): 6251-6256.
- PLESCHKA, S., STAEHELI, P., KOLODZIEJEK, J., RICHT, J. A., NOWOTNY, N., SCHWEMMLE, M. (2001). Conservation of coding potential and terminal sequences in four different isolates of Borna disease virus. *J Gen Virol* 82(Pt 11): 2681-2690.
- PLETNIKOV, M. V., RUBIN, S. A., SCHWARTZ, G. J., MORAN, T. H., SOBOTKA, T. J., CARBONE, K. M. (1999a). Persistent neonatal Borna disease virus (BDV) infection of the brain causes chronic emotional abnormalities in adult rats. *Physiol Behav* 66(5): 823-831.
- PLETNIKOV, M. V., RUBIN, S. A., VASUDEVAN, K., MORAN, T. H., CARBONE, K. M. (1999b). Developmental brain injury associated with abnormal play behavior in neonatally Borna disease virus-infected Lewis rats: a model of autism. *Behav Brain Res* 100(1-2): 43-50.
- POENISCH, M., STAEHELI, P., SCHNEIDER, U. (2008a). Viral accessory protein X stimulates the assembly of functional Borna disease virus polymerase complexes. *J Gen Virol* 89(Pt 6): 1442-1445.

- POENISCH, M., WILLE, S., STAEHEL, P., SCHNEIDER, U. (2008b). Polymerase read-through at the first transcription termination site contributes to regulation of borna disease virus gene expression. *J Virol* 82(19): 9537-9545.
- POROMBKA, D. (2006). Untersuchungen zur Transkription, Replikation und Persistenz des Virus der Bornaschen Krankheit im Gehirn von experimentell infizierten Lewis-Ratten mittels real time RT-PCR. Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover, Dissertation.
- POROMBKA, D., BAUMGÄRTNER, W., EICKMANN, M., HERDEN, C. (2008a). Implications for a regulated replication of Borna disease virus in brains of experimentally infected Lewis rats. *Virus Genes* 36(2): 415-420.
- POROMBKA, D., BAUMGÄRTNER, W., HERDEN, C. (2008b). A rapid method for gene expression analysis of Borna disease virus in neurons and astrocytes using laser microdissection and real-time RT-PCR. *J Virol Methods* 148(1-2): 58-65.
- PRIESTNALL, S. L., SCHONIGER, S., IVENS, P. A., EICKMANN, M., BRACHTHAUSER, L., KEHR, K., TUPPER, C., PIERCY, R. J., MENZIES-GOW, N. J., HERDEN, C. (2011). Borna disease virus infection of a horse in Great Britain. *Vet Rec* 168(14): 380b.
- PUORGER, M. E., HILBE, M., MULLER, J. P., KOLODZIEJEK, J., NOWOTNY, N., ZLINSZKY, K., EHRENSPERGER, F. (2010). Distribution of Borna disease virus antigen and RNA in tissues of naturally infected bicolored white-toothed shrews, *Crocidura leucodon*, supporting their role as reservoir host species. *Vet Pathol* 47(2): 236-244.
- PYPER, J. M., CLEMENTS, J. E., ZINK, M. C. (1998). The nucleolus is the site of Borna disease virus RNA transcription and replication. *J Virol* 72(9): 7697-7702.
- PYPER, J. M., GARTNER, A. E. (1997). Molecular basis for the differential subcellular localization of the 38- and 39-kilodalton structural proteins of Borna disease virus. *J Virol* 71(7): 5133-5139.
- RACANIELLO, V. R. (2006). One hundred years of poliovirus pathogenesis. *Virology* 344(1): 9-16.
- REINACHER, M., BONIN, J., NARAYAN, O., SCHOLTISSEK, C. (1983). Pathogenesis of neurovirulent influenza A virus infection in mice. Route of entry of virus into brain determines infection of different populations of cells. *Lab Invest* 49(6): 686-692.
- REISERT, J., YAU, K. W., MARGOLIS, F. L. (2007). Olfactory marker protein modulates the cAMP kinetics of the odour-induced response in cilia of mouse olfactory receptor neurons. *J Physiol* 585(Pt 3): 731-740.
- REUBER, M., AL-DIN, A. S., BABORIE, A., CHAKRABARTY, A. (2001). New variant Creutzfeldt-Jakob disease presenting with loss of taste and smell. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 71(3): 412-413.
- REUTER, D., SCHNEIDER-SCHAULIES, J. (2010). Measles virus infection of the CNS: human disease, animal models, and approaches to therapy. *Med Microbiol Immunol* 199(3): 261-271.
- RICHT, J., STITZ, L., DESCHL, U., FRESE, K., ROTT, R. (1990). Borna disease virus-induced meningoencephalomyelitis caused by a virus-specific CD4+ T cell-mediated immune reaction. *J Gen Virol* 71 (Pt 11): 2565-2573.

- RICHT, J. A., ALEXANDER, R. C., HERZOG, S., HOOPER, D. C., KEAN, R., SPITSIN, S., BECHTER, K., SCHUTTLER, R., FELDMANN, H., HEISKE, A., FU, Z. F., DIETZSCHOLD, B., ROTT, R., KOPROWSKI, H. (1997a). Failure to detect Borna disease virus infection in peripheral blood leukocytes from humans with psychiatric disorders. *J Neurovirol* 3(2): 174-178.
- RICHT, J. A., CLEMENTS, J. E., HERZOG, S., PYPHER, J., WAHN, K., BECHT, H. (1993a). Analysis of virus-specific RNA species and proteins in Freon-113 preparations of the Borna disease virus. *Med Microbiol Immunol* 182(5): 271-280.
- RICHT, J. A., FURBRINGER, T., KOCH, A., PFEUFFER, I., HERDEN, C., BAUSE-NIEDRIG, I., GARTEN, W. (1998). Processing of the Borna disease virus glycoprotein gp94 by the subtilisin-like endoprotease furin. *J Virol* 72(5): 4528-4533.
- RICHT, J. A., GRABNER, A., HERZOG, S., GARTEN, W., HERDEN, C. (2007). Borna disease in Equines. In: *Equine Infectious diseases*. Elsevier, Sellon, D. C. Long, M. (Hrsg): 201-216.
- RICHT, J. A., HERZOG, S., PYPHER, J., CLEMENTS, J. E., NARAYAN, O., BECHTER, K., ROTT, R. (1993b). Borna disease virus: nature of the etiologic agent and significance of infection in man. *Arch Virol Suppl* 7: 101-109.
- RICHT, J. A., PFEUFFER, I., CHRIST, M., FRESE, K., BECHTER, K., HERZOG, S. (1997b). Borna disease virus infection in animals and humans. *Emerg Infect Dis* 3(3): 343-352.
- RICHT, J. A., ROTT, R. (2001). Borna disease virus: a mystery as an emerging zoonotic pathogen. *Vet J* 161(1): 24-40.
- RICHT, J. A., SCHMEEL, A., FRESE, K., CARBONE, K. M., NARAYAN, O., ROTT, R. (1994). Borna disease virus-specific T cells protect against or cause immunopathological Borna disease. *J Exp Med* 179(5): 1467-1473.
- RICHT, J. A., STITZ, L. (1992). Borna disease virus-infected astrocytes function in vitro as antigen-presenting and target cells for virus-specific CD4-bearing lymphocytes. *Arch Virol* 124(1-2): 95-109.
- RICHT, J. A., STITZ, L., WEKERLE, H., ROTT, R. (1989). Borna disease, a progressive meningoencephalomyelitis as a model for CD4+ T cell-mediated immunopathology in the brain. *J Exp Med* 170(3): 1045-1050.
- RONNETT, G. V., HESTER, L. D., SNYDER, S. H. (1991). Primary culture of neonatal rat olfactory neurons. *J Neurosci* 11(5): 1243-1255.
- ROSARIO, D., PEREZ, M., DE LA TORRE, J. C. (2005). Functional characterization of the genomic promoter of borna disease virus (BDV): implications of 3'-terminal sequence heterogeneity for BDV persistence. *J Virol* 79(10): 6544-6550.
- ROSKAMS, A. J., BETHEL, M. A., HURT, K. J., RONNETT, G. V. (1996). Sequential expression of Trks A, B, and C in the regenerating olfactory neuroepithelium. *J Neurosci* 16(4): 1294-1307.
- ROSSEELS, V., NAZE, F., DE CRAEYE, S., FRANCAERT, A., KALAI, M., VAN GUCHT, S. (2011). A non-invasive intranasal inoculation technique using isoflurane anesthesia to infect the brain of mice with rabies virus. *J Virol Methods* 173(1): 127-136.

- RÖSSLER, P., MEZLER, M., BREER, H. (1998). Two olfactory marker proteins in *Xenopus laevis*. *J Comp Neurol* 395(3): 273-280.
- ROTT, R., BECHT, H. (1995). Natural and experimental Borna disease in animals. *Curr Top Microbiol Immunol* 190: 17-30.
- ROTT, R., HERZOG, S., FLEISCHER, B., WINOKUR, A., AMSTERDAM, J., DYSON, W., KOPROWSKI, H. (1985). Detection of serum antibodies to Borna disease virus in patients with psychiatric disorders. *Science* 228(4700): 755-756.
- RUBBENSTROTH, D., RINDER, M., STEIN, M., HOPER, D., KASPERS, B., BROSINSKI, K., HORIE, M., SCHMIDT, V., LEGLER, M., KORBEL, R., STAEHELI, P. (2013). Avian bornaviruses are widely distributed in canary birds (*Serinus canaria f. domestica*). *Vet Microbiol* 165(3-4): 287-295.
- RUBBENSTROTH, D., SCHMIDT, V., RINDER, M., LEGLER, M., CORMAN, V. M., STAEHELI, P. (2014). Discovery of a new avian bornavirus genotype in estrildid finches (Estrildidae) in Germany. *Vet Microbiol* 168(2-4): 318-323.
- RUBIN, S. A., SYLVES, P., VOGEL, M., PLETNIKOV, M., MORAN, T. H., SCHWARTZ, G. J., CARBONE, K. M. (1999). Borna disease virus-induced hippocampal dentate gyrus damage is associated with spatial learning and memory deficits. *Brain Res Bull* 48(1): 23-30.
- RUBIN, S. A., WALTRIP, R. W., 2ND, BAUTISTA, J. R., CARBONE, K. M. (1993). Borna disease virus in mice: host-specific differences in disease expression. *J Virol* 67(1): 548-552.
- RUDD, P. A., CATTANEO, R., VON MESSLING, V. (2006). Canine distemper virus uses both the anterograde and the hematogenous pathway for neuroinvasion. *J Virol* 80(19): 9361-9370.
- RUSSELL, W. M. S., BURCH, R. L. (1959). *The Principles of Humane Experimental Technique*. Methuen, London.
- SABIN, A. B., WARD, R. (1941). The Natural History of Human Poliomyelitis : li. Elimination of the Virus. *J Exp Med* 74(6): 519-529.
- SALAZAR, I., SANCHEZ-QUINTEIRO, P. (2011). A detailed morphological study of the vomeronasal organ and the accessory olfactory bulb of cats. *Microsc Res Tech* 74(12): 1109-1120.
- SALINAS, S., BILSLAND, L. G., HENAFF, D., WESTON, A. E., KERIEL, A., SCHIAVO, G., KREMER, E. J. (2009). CAR-associated vesicular transport of an adenovirus in motor neuron axons. *PLoS Pathog* 5(5): e1000442.
- SALINAS, S., SCHIAVO, G., KREMER, E. J. (2010). A hitchhiker's guide to the nervous system: the complex journey of viruses and toxins. *Nat Rev Microbiol* 8(9): 645-655.
- SAUDER, C., HALLENSLEBEN, W., PAGENSTECHER, A., SCHNECKENBURGER, S., BIRO, L., PERTLIK, D., HAUSMANN, J., SUTER, M., STAEHELI, P. (2000). Chemokine gene expression in astrocytes of Borna disease virus-infected rats and mice in the absence of inflammation. *J Virol* 74(19): 9267-9280.
- SAUDER, C., MULLER, A., CUBITT, B., MAYER, J., STEINMETZ, J., TRABERT, W., ZIEGLER, B., WANKE, K., MUELLER-LANTZSCH, N., DE LA TORRE, J. C., GRASSER, F. A. (1996). Detection of Borna disease virus (BDV) antibodies and BDV RNA in psychiatric

patients: evidence for high sequence conservation of human blood-derived BDV RNA. *J Virol* 70(11): 7713-7724.

SAUDER, C., STAEHELI, P. (2003). Rat Model of Borna Disease Virus Transmission: Epidemiological Implications. *J Virol* 77(23): 12886-12890.

SCHAMEL, K., STAEHELI, P., HAUSMANN, J. (2001). Identification of the immunodominant H-2K(k)-restricted cytotoxic T-cell epitope in the Borna disease virus nucleoprotein. *J Virol* 75(18): 8579-8588.

SCHMIDT, J. (1912). Untersuchung über das klinische Verhalten der seuchenhaften Gehirn-Rückenmarksentzündung (Bornasche Krankheit) des Pferdes nebst Angaben über diesbezügliche therapeutische Versuche. *Berl Münch Tierärztl Wschr.*(28): 581-586.

SCHMIDT, J. (1952). Die Bornakrankheit des Pferdes. 55 Jahre Forschung und Lehre. *Arch Exp Veterinärmed*(6): 177-187.

SCHNEEMANN, A., SCHNEIDER, P. A., KIM, S., LIPKIN, W. I. (1994). Identification of signal sequences that control transcription of borna disease virus, a nonsegmented, negative-strand RNA virus. *J Virol* 68(10): 6514-6522.

SCHNEEMANN, A., SCHNEIDER, P. A., LAMB, R. A., LIPKIN, W. I. (1995). The remarkable coding strategy of borna disease virus: a new member of the nonsegmented negative strand RNA viruses. *Virology* 210(1): 1-8.

SCHNEIDER, P. A., HATALSKI, C. G., LEWIS, A. J., LIPKIN, W. I. (1997a). Biochemical and functional analysis of the Borna disease virus G protein. *J Virol* 71(1): 331-336.

SCHNEIDER, P. A., KIM, R., LIPKIN, W. I. (1997b). Evidence for translation of the Borna disease virus G protein by leaky ribosomal scanning and ribosomal reinitiation. *J Virol* 71(7): 5614-5619.

SCHNEIDER, P. A., SCHNEEMANN, A., LIPKIN, W. I. (1994). RNA splicing in Borna disease virus, a nonsegmented, negative-strand RNA virus. *J Virol* 68(8): 5007-5012.

SCHNEIDER, U. (2005). Novel insights into the regulation of the viral polymerase complex of neurotropic Borna disease virus. *Virus Res* 111(2): 148-160.

SCHNEIDER, U., BLECHSCHMIDT, K., SCHWEMMLE, M., STAEHELI, P. (2004). Overlap of interaction domains indicates a central role of the P protein in assembly and regulation of the Borna disease virus polymerase complex. *J Biol Chem* 279(53): 55290-55296.

SCHNEIDER, U., NAEGELE, M., STAEHELI, P., SCHWEMMLE, M. (2003). Active borna disease virus polymerase complex requires a distinct nucleoprotein-to-phosphoprotein ratio but no viral X protein. *J Virol* 77(21): 11781-11789.

SCHNEIDER, U., SCHWEMMLE, M., STAEHELI, P. (2005). Genome trimming: a unique strategy for replication control employed by Borna disease virus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102(9): 3441-3446.

SCHOLZEN, T., GERDES, J. (2000). The Ki-67 protein: from the known and the unknown. *J Cell Physiol* 182(3): 311-322.

SCHROEDER, W. (2015). Volatile S-nitrosothiols and the typical smell of cancer. *J Breath Res* 9(1): 016010.

- SCHWARDT, M., MAYER, D., FRANK, R., SCHNEIDER, U., EICKMANN, M., PLANZ, O., WOLFF, T., SCHWEMMLE, M. (2005). The negative regulator of Borna disease virus polymerase is a non-structural protein. *J Gen Virol* 86(Pt 11): 3163-3169.
- SCHWARTZ LEVEY, M., CHIKARAISHI, D. M., KAUER, J. S. (1991). Characterization of potential precursor populations in the mouse olfactory epithelium using immunocytochemistry and autoradiography. *J Neurosci* 11(11): 3556-3564.
- SCHWEMMLE, M., BILLICH, C. (2004). The use of peptide arrays for the characterization of monospecific antibody repertoires from polyclonal sera of psychiatric patients suspected of infection by Borna Disease Virus. *Mol Divers* 8(3): 247-250.
- SCHWEMMLE, M., JEHLE, C., FORMELLA, S., STAEHELI, P. (1999). Sequence similarities between human bornavirus isolates and laboratory strains question human origin. *Lancet* 354(9194): 1973-1974.
- SCHWEMMLE, M., SALVATORE, M., SHI, L., RICHT, J., LEE, C. H., LIPKIN, W. I. (1998). Interactions of the borna disease virus P, N, and X proteins and their functional implications. *J Biol Chem* 273(15): 9007-9012.
- SCHWERK, C., TENENBAUM, T., KIM, K. S., SCHROTEN, H. (2015). The choroid plexus-a multi-role player during infectious diseases of the CNS. *Front Cell Neurosci* 9: 80.
- SCHWOB, J. E. (2002). Neural regeneration and the peripheral olfactory system. *Anat Rec* 269(1): 33-49.
- SCHWOB, J. E., HUARD, J. M., LUSKIN, M. B., YOUNGENTOB, S. L. (1994). Retroviral lineage studies of the rat olfactory epithelium. *Chem Senses* 19(6): 671-682.
- SCHWOB, J. E., YOUNGENTOB, S. L., MEZZA, R. C. (1995). Reconstitution of the rat olfactory epithelium after methyl bromide-induced lesion. *J Comp Neurol* 359(1): 15-37.
- SHANKAR, V., KAO, M., HAMIR, A. N., SHENG, H., KOPROWSKI, H., DIETZSCHOLD, B. (1992). Kinetics of virus spread and changes in levels of several cytokine mRNAs in the brain after intranasal infection of rats with Borna disease virus. *J Virol* 66(2): 992-998.
- SHAPIRO, L. A., NG, K. L., KINYAMU, R., WHITAKER-AZMITIA, P., GEISERT, E. E., BLURTON-JONES, M., ZHOU, Q. Y., RIBAK, C. E. (2007). Origin, migration and fate of newly generated neurons in the adult rodent piriform cortex. *Brain Struct Funct* 212(2): 133-148.
- SHOYA, Y., KOBAYASHI, T., KODA, T., IKUTA, K., KAKINUMA, M., KISHI, M. (1998). Two proline-rich nuclear localization signals in the amino- and carboxyl-terminal regions of the Borna disease virus phosphoprotein. *J Virol* 72(12): 9755-9762.
- SHUKLA, D., SCANLAN, P. M., TIWARI, V., SHETH, V., CLEMENT, C., GUZMAN-HARTMAN, G., DERMODY, T. S., VALYI-NAGY, T. (2006). Expression of nectin-1 in normal and herpes simplex virus type 1-infected murine brain. *Appl Immunohistochem Mol Morphol* 14(3): 341-347.
- SIEMETZKI, U., ASHOK, M. S., BRIESE, T., LIPKIN, W. I. (2009). Identification of RNA instability elements in Borna disease virus. *Virus Res* 144(1-2): 27-34.
- SOUDAIS, C., LAPLACE-BUILHE, C., KISSA, K., KREMER, E. J. (2001). Preferential transduction of neurons by canine adenovirus vectors and their efficient retrograde transport in vivo. *FASEB J* 15(12): 2283-2285.

- SPRANKEL, H., RICHARZ, K., LUDWIG, H., ROTT, R. (1978). Behavior alterations in tree shrews (*Tupaia glis*, Diard 1820) induced by Borna disease virus. *Med Microbiol Immunol* 165(1): 1-18.
- SPUDICH, S., GONZALEZ-SCARANO, F. (2012). HIV-1-related central nervous system disease: current issues in pathogenesis, diagnosis, and treatment. *Cold Spring Harb Perspect Med* 2(6): a007120.
- STAEHELI, P. (2002). Bornaviruses. *Virus Res* 82(1-2): 55-59.
- STAEHELI, P., RINDER, M., KASPERS, B. (2010). Avian bornavirus associated with fatal disease in psittacine birds. *J Virol* 84(13): 6269-6275.
- STAEHELI, P., SAUDER, C., HAUSMANN, J., EHRENSPERGER, F., SCHWEMMLE, M. (2000). Epidemiology of Borna disease virus. *J Gen Virol* 81(Pt 9): 2123-2135.
- STENGLEIN, M. D., LEAVITT, E. B., ABRAMOVITCH, M. A., MCGUIRE, J. A., DERISI, J. L. (2014). Genome Sequence of a Bornavirus Recovered from an African Garter Snake (*Elapsoidea loveridgei*). *Genome Announc* 2(5).
- STERNBERGER, L. A. (1979). The unlabeled antibody (PAP) method, introduction. *J Histochem Cytochem* 27(12): 1657.
- STITZ, L., BILZER, T., PLANZ, O. (2002). The immunopathogenesis of Borna disease virus infection. *Front Biosci* 7: d541-555.
- STITZ, L., DIETZSCHOLD, B., CARBONE, K. M. (1995). Immunopathogenesis of Borna disease. *Curr Top Microbiol Immunol* 190: 75-92.
- STITZ, L., NOSKE, K., PLANZ, O., FURRER, E., LIPKIN, W. I., BILZER, T. (1998). A functional role for neutralizing antibodies in Borna disease: influence on virus tropism outside the central nervous system. *J Virol* 72(11): 8884-8892.
- STITZ, L., PLANZ, O., BILZER, T., FREI, K., FONTANA, A. (1991a). Transforming growth factor-beta modulates T cell-mediated encephalitis caused by Borna disease virus. Pathogenic importance of CD8+ cells and suppression of antibody formation. *J Immunol* 147(10): 3581-3586.
- STITZ, L., SCHILKEN, D., FRESE, K. (1991b). Atypical dissemination of the highly neurotropic Borna disease virus during persistent infection in cyclosporine A-treated, immunosuppressed rats. *J Virol* 65(1): 457-460.
- STITZ, L., SOBBE, M., BILZER, T. (1992). Preventive effects of early anti-CD4 or anti-CD8 treatment on Borna disease in rats. *J Virol* 66(6): 3316-3323.
- STITZ, L., SOEDER, D., DESCHL, U., FRESE, K., ROTT, R. (1989). Inhibition of immune-mediated meningoencephalitis in persistently Borna disease virus-infected rats by cyclosporine A. *J Immunol* 143(12): 4250-4256.
- STUDAHL, M. (2003). Influenza virus and CNS manifestations. *J Clin Virol* 28(3): 225-232.
- SUCHY, A., WEISSENBOECK, H., WALLER, R., SCHMIDT, P., NOWOTNY, N. (1997). Nachweis der Bornaschen Krankheit bei einem Pferd in Österreich. *Wien. Tierärztl. Mschr.*(84): 317-321.

- TAN, C. S., STEVENSON, P. G. (2014). B cell response to herpesvirus infection of the olfactory neuroepithelium. *J Virol* 88(24): 14030-14039.
- TANIYAMA, H., OKAMOTO, M., HIRAYAMA, K., HAGIWARA, K., KIRISAWA, R., KAMITANI, W., TSUNODA, N., IKUTA, K. (2001). Equine Borna disease in Japan. *Vet Rec* 148(15): 480-482.
- TATSUO, H., ONO, N., TANAKA, K., YANAGI, Y. (2000). SLAM (CDw150) is a cellular receptor for measles virus. *Nature* 406(6798): 893-897.
- TAVERNA, G., TIDU, L., GRIZZI, F., TORRI, V., MANDRESSI, A., SARDELLA, P., LA TORRE, G., COCCIOLONE, G., SEVESO, M., GIUSTI, G., HURLE, R., SANTORO, A., GRAZIOTTI, P. (2015). Olfactory system of highly trained dogs detects prostate cancer in urine samples. *J Urol* 193(4): 1382-1387.
- TERAYAMA, H., NISHINO, Y., KISHI, M., IKUTA, K., ITOH, M., IWAHASHI, K. (2003). Detection of anti-Borna Disease Virus (BDV) antibodies from patients with schizophrenia and mood disorders in Japan. *Psychiatry Res* 120(2): 201-206.
- THIERER, J., RIEHLE, H., GREBENSTEIN, O., BINZ, T., HERZOG, S., THIEDEMANN, N., STITZ, L., ROTT, R., LOTTSPEICH, F., NIEMANN, H. (1992). The 24K protein of Borna disease virus. *J Gen Virol* 73 (Pt 2): 413-416.
- THORSEN, J., LITTLE, P. B. (1975). Isolation of equine herpesvirus type 1 from a horse with an acute paralytic disease. *Can J Comp Med* 39(3): 358-359.
- THOULOUBE, M. I., LAFAGE, M., SCHACHNER, M., HARTMANN, U., CREMER, H., LAFON, M. (1998). The neural cell adhesion molecule is a receptor for rabies virus. *J Virol* 72(9): 7181-7190.
- TJALVE, H., HENRIKSSON, J. (1999). Uptake of metals in the brain via olfactory pathways. *Neurotoxicology* 20(2-3): 181-195.
- TOMONAGA, K., KOBAYASHI, T., IKUTA, K. (2002). Molecular and cellular biology of Borna disease virus infection. *Microbes Infect* 4(4): 491-500.
- TOMONAGA, K., KOBAYASHI, T., LEE, B. J., WATANABE, M., KAMITANI, W., IKUTA, K. (2000). Identification of alternative splicing and negative splicing activity of a nonsegmented negative-strand RNA virus, Borna disease virus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97(23): 12788-12793.
- TWOMEY, J. A., BARKER, C. M., ROBINSON, G., HOWELL, D. A. (1979). Olfactory mucosa in herpes simplex encephalitis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 42(11): 983-987.
- VAHLENKAMP, T. W., KONRATH, A., WEBER, M., MULLER, H. (2002). Persistence of Borna disease virus in naturally infected sheep. *J Virol* 76(19): 9735-9743.
- VAN RIEL, D., VERDIJK, R., KUIKEN, T. (2015). The olfactory nerve: a shortcut for influenza and other viral diseases into the central nervous system. *J Pathol* 235(2): 277-287.
- VANDESOMPELE, J., DE PRETER, K., PATTYN, F., POPPE, B., VAN ROY, N., DE PAEPE, A., SPELEMAN, F. (2002). Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol* 3(7): RESEARCH0034.

- VANDEVELDE, M., ZURBRIGGEN, A. (2005). Demyelination in canine distemper virus infection: a review. *Acta Neuropathol* 109(1): 56-68.
- VARGAS, G., LUCERO, M. T. (1999a). Dopamine modulates inwardly rectifying hyperpolarization-activated current (I_h) in cultured rat olfactory receptor neurons. *J Neurophysiol* 81(1): 149-158.
- VARGAS, G., LUCERO, M. T. (1999b). A method for maintaining odor-responsive adult rat olfactory receptor neurons in short-term culture. *Chem Senses* 24(2): 211-216.
- VERHAAGEN, J., GREER, C. A., MARGOLIS, F. L. (1990). B-50/GAP43 Gene Expression in the Rat Olfactory System During Postnatal Development and Aging. *Eur J Neurosci* 2(5): 397-407.
- WALKER, M. P., JORDAN, I., BRIESE, T., FISCHER, N., LIPKIN, W. I. (2000). Expression and characterization of the Borna disease virus polymerase. *J Virol* 74(9): 4425-4428.
- WALKER, M. P., LIPKIN, W. I. (2002). Characterization of the nuclear localization signal of the borna disease virus polymerase. *J Virol* 76(16): 8460-8467.
- WALTER, J., SEEH, C., FEY, K., BLEUL, U., OSTERRIEDER, N. (2013). Clinical observations and management of a severe equine herpesvirus type 1 outbreak with abortion and encephalomyelitis. *Acta Vet Scand* 55: 19.
- WALTRIP, R. W., 2ND, BUCHANAN, R. W., SUMMERFELT, A., BREIER, A., CARPENTER, W. T., JR., BRYANT, N. L., RUBIN, S. A., CARBONE, K. M. (1995). Borna disease virus and schizophrenia. *Psychiatry Res* 56(1): 33-44.
- WANG, T., TOWN, T., ALEXOPOULOU, L., ANDERSON, J. F., FIKRIG, E., FLAVELL, R. A. (2004). Toll-like receptor 3 mediates West Nile virus entry into the brain causing lethal encephalitis. *Nat Med* 10(12): 1366-1373.
- WATANABE, M., ZHONG, Q., KOBAYASHI, T., KAMITANI, W., TOMONAGA, K., IKUTA, K. (2000). Molecular ratio between borna disease viral-p40 and -p24 proteins in infected cells determined by quantitative antigen capture ELISA. *Microbiol Immunol* 44(9): 765-772.
- WATANABE, Y., YANAI, H., OHTAKI, N., IKUTA, K., TOMONAGA, K. (2006). Prevalence of Borna disease virus antibodies in healthy Japanese black cattle in Kyushu. *J Vet Med Sci* 68(2): 171-174.
- WEHNER, T., RUPPERT, A., HERDEN, C., FRESE, K., BECHT, H., RICHT, J. A. (1997). Detection of a novel Borna disease virus-encoded 10 kDa protein in infected cells and tissues. *J Gen Virol* 78 (Pt 10): 2459-2466.
- WEILER, E., BENALI, A. (2005). Olfactory epithelia differentially express neuronal markers. *J Neurocytol* 34(3-5): 217-240.
- WEILER, E., FARBMAN, A. I. (1998a). Proliferation decrease in the olfactory epithelium during postnatal development. *Ann N Y Acad Sci* 855: 230-234.
- WEILER, E., FARBMAN, A. I. (1998b). Supporting cell proliferation in the olfactory epithelium decreases postnatally. *Glia* 22(4): 315-328.
- WEINGER, J. G., MARRO, B. S., HOSKING, M. P., LANE, T. E. (2013). The chemokine receptor CXCR2 and coronavirus-induced neurologic disease. *Virology* 435(1): 110-117.

- WEISSENBÖCK, H., BAKONYI, T., SEKULIN, K., EHRENSPERGER, F., DONELEY, R. J., DÜRRWALD, R., HOOP, R., ERDELYI, K., GAL, J., KOLODZIEJEK, J., NOWOTNY, N. (2009a). Avian bornaviruses in psittacine birds from Europe and Australia with proventricular dilatation disease. *Emerg Infect Dis* 15(9): 1453-1459.
- WEISSENBÖCK, H., HORNIG, M., HICKEY, W. F., LIPKIN, W. I. (2000). Microglial activation and neuronal apoptosis in Bornavirus infected neonatal Lewis rats. *Brain Pathol* 10(2): 260-272.
- WEISSENBÖCK, H., NOWOTNY, N., CAPLAZI, P., KOLODZIEJEK, J., EHRENSPERGER, F. (1998). Borna disease in a dog with lethal meningoencephalitis. *J Clin Microbiol* 36(7): 2127-2130.
- WEISSENBÖCK, H., SEKULIN, K., BAKONYI, T., HOGLER, S., NOWOTNY, N. (2009b). Novel avian bornavirus in a nonpsittacine species (Canary; *Serinus canaria*) with enteric ganglioneuritis and encephalitis. *J Virol* 83(21): 11367-11371.
- WEISSENBÖCK, H., SUCHY, A., CAPLAZI, P., HERZOG, S., NOWOTNY, N. (1998). Borna disease in Austrian horses. *Vet Rec* 143(1): 21-22.
- WENSMAN, J. J., JADERLUND, K. H., HOLST, B. S., BERG, M. (2013). Borna disease virus infection in cats. *Vet J*.
- WENTZ, E. (2009). Untersuchung zur Expression der dritten Transkriptionseinheit des Virus der Bornaschen Krankheit. Philipps-Universität Marburg, Fachbereich Biologie, Diplomarbeit.
- WERNER-KEIŠŠ, N. (2006). Untersuchungen zur Expression von Strukturproteinen des Virus der Bornaschen Krankheit an intrazerebral infizierten Lewis-Ratten. Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover, Dissertation.
- WERNER-KEIŠŠ, N., GARTEN, W., RICHT, J. A., POROMBKA, D., ALGERMISSEN, D., HERZOG, S., BAUMGÄRTNER, W., HERDEN, C. (2008). Restricted expression of Borna disease virus glycoprotein in brains of experimentally infected Lewis rats. *Neuropathol Appl Neurobiol* 34(6): 590-602.
- WETZIG, A., MACKAY-SIM, A., MURRELL, W. (2011). Characterization of olfactory stem cells. *Cell Transplant* 20(11-12): 1673-1691.
- WILSON, E. H., WENINGER, W., HUNTER, C. A. (2010). Trafficking of immune cells in the central nervous system. *J Clin Invest* 120(5): 1368-1379.
- WINKLER (1883). Über die Ursachen der subakuten Gehirnentzündung. *Arch wiss prakt Tierhk* 9: 419-419.
- WINKLER, W. G., FASHINELL, T. R., LEFFINGWELL, L., HOWARD, P., CONOMY, P. (1973). Airborne rabies transmission in a laboratory worker. *JAMA* 226(10): 1219-1221.
- WOLFF, T., HEINS, G., PAULI, G., BURGER, R., KURTH, R. (2006). Failure to detect Borna disease virus antigen and RNA in human blood. *J Clin Virol* 36(4): 309-311.
- WOLFF, T., PFLEGER, R., WEHNER, T., REINHARDT, J., RICHT, J. A. (2000). A short leucine-rich sequence in the Borna disease virus p10 protein mediates association with the viral phospho- and nucleoproteins. *J Gen Virol* 81(Pt 4): 939-947.
- WÖRZ, J. J. (1858). Die halb-acute Gehirn-Entzündung oder Kopfkrankheit der Pferde. Ebner & Seubert, Stuttgart.

- WUNSCHMANN, A., HONKAVUORI, K., BRIESE, T., LIPKIN, W. I., SHIVERS, J., ARMIEN, A. G. (2011). Antigen tissue distribution of Avian bornavirus (ABV) in psittacine birds with natural spontaneous proventricular dilatation disease and ABV genotype 1 infection. *J Vet Diagn Invest* 23(4): 716-726.
- YANAI, H., HAYASHI, Y., WATANABE, Y., OHTAKI, N., KOBAYASHI, T., NOZAKI, Y., IKUTA, K., TOMONAGA, K. (2006). Development of a novel Borna disease virus reverse genetics system using RNA polymerase II promoter and SV40 nuclear import signal. *Microbes Infect* 8(6): 1522-1529.
- YASUNO, H., FUKAZAWA, K., FUKUOKA, T., KONDO, E., SAKAGAMI, M., NOGUCHI, K. (2000). Nerve growth factor applied onto the olfactory epithelium alleviates degenerative changes of the olfactory receptor neurons following axotomy. *Brain Res* 887(1): 53-62.
- YILMAZ, H., HELPS, C. R., TURAN, N., UYSAL, A., HARBOUR, D. A. (2002). Detection of antibodies to Borna disease virus (BDV) in Turkish horse sera using recombinant p40. Brief report. *Arch Virol* 147(2): 429-435.
- YOON, M., SPEAR, P. G. (2002). Disruption of adherens junctions liberates nectin-1 to serve as receptor for herpes simplex virus and pseudorabies virus entry. *J Virol* 76(14): 7203-7208.
- ZANUSSO, G., FERRARI, S., CARDONE, F., ZAMPIERI, P., GELATI, M., FIORINI, M., FARINAZZO, A., GARDIMAN, M., CAVALLARO, T., BENTIVOGLIO, M., RIGHETTI, P. G., POCCHIARI, M., RIZZUTO, N., MONACO, S. (2003). Detection of pathologic prion protein in the olfactory epithelium in sporadic Creutzfeldt-Jakob disease. *N Engl J Med* 348(8): 711-719.
- ZHANG, L., WANG, X., ZHAN, Q., WANG, Z., XU, M., ZHU, D., HE, F., LIU, X., HUANG, R., LI, D., LEI, Y., XIE, P. (2014). Evidence for natural Borna disease virus infection in healthy domestic animals in three areas of western China. *Arch Virol*.
- ZHANG, L., XU, M. M., ZENG, L., LIU, S., LIU, X., WANG, X., LI, D., HUANG, R. Z., ZHAO, L. B., ZHAN, Q. L., ZHU, D., ZHANG, Y. Y., XU, P., XIE, P. (2013). Evidence for Borna disease virus infection in neuropsychiatric patients in three western China provinces. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*.
- ZHOU, J., STOHLMAN, S. A., HINTON, D. R., MARTEN, N. W. (2003). Neutrophils promote mononuclear cell infiltration during viral-induced encephalitis. *J Immunol* 170(6): 3331-3336.
- ZIEGE, S., BAUMGÄRTNER, W., WEWETZER, K. (2013). Toward defining the regenerative potential of olfactory mucosa: establishment of Schwann cell-free adult canine olfactory ensheathing cell preparations suitable for transplantation. *Cell Transplant* 22(2): 355-367.
- ZIMMERMANN, W., BRETER, H., RUDOLPH, M., LUDWIG, H. (1994). Borna disease virus: immunoelectron microscopic characterization of cell-free virus and further information about the genome. *J Virol* 68(10): 6755-6758.
- ZURBRIGGEN, A., MULLER, C., VANDEVELDE, M. (1993). In situ hybridization of virulent canine distemper virus in brain tissue, using digoxigenin-labeled probes. *Am J Vet Res* 54(9): 1457-1461.
- ZWICK, W. (1939). Bornasche Krankheit und Encephalomyelitis der Tiere. In: *Handbuch der Viruskrankheiten*. Gildemeister, E. Haagen, E. Waldmann, O. (Hrsg), Gustav Fischer Verlag, Jena: 254-356.

ZWICK, W., SEIFRIED, O. (1925). Übertragbarkeit der seuchenhaften Gehirn- und Rückenmarksentzündung des Pferdes (Bornasche Krankheit) auf kleine Versuchstiere (Kaninchen). Berl Tierärztl Wochenschr (41): 129-132.

ZWICK, W., SEIFRIED, O., WITTE, J. (1926). Experimentelle Untersuchungen über die seuchenhafte Gehirnrückenmarksentzündung der Pferde (Bornasche Krankheit). Zeitschr Inf Krkh Haustiere (30): 42-136.

8. ANHANG

8.1 LÖSUNGEN UND PUFFER

8.1.1 Histologie

EDTA-Lösung

100 g EDTA (Ethyldiamin-tetraessigsäure Dinatriumsalz Dihydrat)

50 ml 4 M NaOH

1 l Aqua dest.

EDTA mit ca. 600 ml Aqua dest. aufschwemmen und 50 ml 4 M NaOH dazu geben. Auf Magnetrührer lösen. Den pH-Wert mit 4 M NaOH auf 7,4 einstellen, auf 1 l mit Aqua dest. auffüllen.

Klotzsche Lösung

900 ml Wasser

0,5 g NaCl

0,9 g Natriumhydrogencarbonat

1,0 g Chloralhydrat,

1,1 g Natriumsulfat

100 ml Formalin 37 %

8.1.2 Immunhistologie und Immunfluoreszenz

Tris-buffered saline (TBS), pH 7,6

Stammlösung (10x):

60,57 g Tris (hydroxymethyl)-aminomethan

610 ml Aqua dest.

390 ml 1 N HCl

Einstellen des pH-Wertes mit 1 N HCl auf 7,6.

Gebrauchslösung:

100 ml Stammlösung

900 ml NaCl 0,8% in Aqua dest.

Einstellen des pH-Wertes mit 1 N HCl oder 1 N NaOH auf 7,6.

Imidazol/HCl-Puffer 0,1 M (pH 7,1)

6,81 g Imidazol

1000 ml Aqua dest.

500 ml 0,1 M HCl

Den pH-Wert mit 0,1 N HCl auf 7,1 einstellen.

3,3'-Diaminobenzidin-tetrahydrochlorid-Dihydrat-Lösung (DAB)

100 mg DAB

200 ml 0,1 M Imidazol/HCl-Puffer (pH 7,1)

Mit Magnetrührer mischen und mit Filterpapier (Machery-Nagel GmbH & Co. KG, Düren) filtrieren.

Unmittelbar vor Gebrauch 70 µl 30%iges H₂O₂ zugeben.

Zitratpuffer (10 mM, pH 6,0 und 4,0)

Stammlösung A:

0,1 M Zitronensäure (21,01 g C₆H₈O₇, in 1000 ml Aqua dest.)

Stammlösung B:

0,1 M Natriumzitrat (29,41 g C₆H₅Na₃O₇ x H₂O, in 1000 ml Aqua dest.)

9 ml Stammlösung A mit 41 ml Stammlösung B mischen.

450 ml Aqua dest. zugeben und mit 0,1 N HCl auf pH 4,0 oder 6,0 einstellen.

Kardasewitsch

200 ml 25 % Ammoniaklösung

800 ml 70 % Ethanol

Papanicolaous Gebrauchslösung

Papanicolaous Hämatoxylin 1b mit Aqua dest. im Verhältnis 1:10 verdünnen und filtrieren.

4%iges Paraformaldehyd (PFA) in Zellkulturmedium, pH 7,35-7,4

10 g PFA

250 ml Zellkulturmedium (DMEM oder Neurobasal®-A Medium, Gibco)

Auf Magnetrührer bei ca. 60-70 °C lösen, nicht autoklavieren.

8.1.3 Sondenherstellung und *In-situ*-Hybridisierung

Alle Puffer und Lösungen werden, soweit nicht anders angegeben, autoklaviert. Bei Puffer 3 und 1x PBS + 5 mM MgCl₂ werden die Grundlösungen autoklaviert und das MgCl₂ wird steril filtriert kurz vor Gebrauch hinzu gegeben.

0,2 M EDTA, pH 8,0

0,4 ml 0,5 M EDTA-Lösung (siehe unten)

0,6 ml Aqua bidest.

Aqua bidest.

Wie alle Lösungen autoklavieren.

Aqua bidest./DEPC

1 ml DEPC (Diethylpyrokarbonat)

1000 ml Aqua bidest.

Im Abzug über Nacht auf Magnetrührer rühren lassen und autoklavieren. 10x PBS / 1x PBS
("phosphate buffered saline")

Stammlösung, 10x konzentriert:

80,0 g NaCl

2,0 g Kaliumchlorid

14,4 g Natriumhydrogenphosphat

2,4 g Kaliumhydrogenphosphat

1000 ml Aqua bidest.

Gebrauchslösung, 1x konzentriert:

1:10 mit Aqua bidest. verdünnen.

pH-Wert mit 1 N NaOH auf 7,4 einstellen.

4%iges Paraformaldehyd (PFA), pH 7,35-7,4

10 g PFA

250 ml PBS, pH 7,4

Auf Magnetrührer bei ca. 60-70 °C lösen, nicht autoklavieren.

1M Tris-HCl, pH 8,0

12,11 g Tris-HCl (MG: 121,14)

100 ml Aqua bidest.

Mit 1 N HCl pH-Wert auf 8,0 einstellen.

0,1 M CaCl₂

1,47g CaCl₂ (MG: 147,02)

100 ml Aqua bidest.

1 M MgCl₂

20,33g MgCl₂ (MG: 203,3)

100 ml Aqua bidest.

NaClFür Hybridisierungssalze : 5 M

29,22 g NaCl (MG: 58,44)

100 ml Aqua bidest.

Für RNase-Behandlung: 3 M

87,66 g NaCl (MG: 58,44)
500 ml Aqua bidest.

0,2 N HCl

50 ml 2 N HCl
450 ml Aqua bidest.
Nicht autoklavieren.

2 N HCl

41,40 ml 37% HCl
208,60 ml Aqua bidest.
Nicht autoklavieren.

5 N NaOH

20 g NaOH-Plätzchen (MG: 40)
100 ml Aqua bidest.
Nicht autoklavieren.

0,5 M EDTA, pH 8,0

18,6 g EDTA (di-Natrium-EDTA-di-Hydrat, MG: 372,3)
60 ml Aqua bidest./DEPC
pH-Wert 8,0 mit 5 N NaOH einstellen, auf 100 ml auffü llen.

PIPES (0,5 M Piperazin-N,N`bis[2-ethansulfatsäure])

Für Hybridisierungssalze.
8,6575 g PIPES (MG: 346,3)
50 ml Aqua bidest.

20x SSC / 2x SSC / 0,2x SSC („standard saline citrate“)

Stammlösung, 20x konzentriert:
175,3 g NaCl
88,2 g Natriumzitat (tri-Natriumcitrat-di-Hydrat)
800 ml Aqua bidest.
pH-Wert 7,0 mit 1N HCl einstellen und auf 1000 ml auffü llen.
Gebrauchslösung 2x konzentriert (frisch und mit sterilem Aqua bidest. ansetzen):
50 ml Stammlösung
ad. 500 ml Aqua bidest.
Gebrauchslösung 0,2x konzentriert (frisch und mit sterilem Aqua bidest. ansetzen)
2,5 ml Stammlösung
ad. 250 ml Aqua bidest.

Puffer 1, pH 7,5

12,11 g Tris (MG: 121,14)
8,77 g NaCl (MG: 58,44)
1000 ml Aqua bidest.

Puffer 2 (Blocking-Lösung)

1,2 ml steriles neutrales Schafserum
1,8 ml 10%iges Triton® X-100
ad. 60 ml Puffer 1.

Puffer 3, pH 9,5

3,633 g Tris (MG: 121,14)
1,752 g NaCl (MG: 58,44)
in 200 ml Aqua bidest. lösen, pH-Wert mit 1 N HCl auf 9,5 einstellen.
Ad. 300 ml Aqua bidest., autoklavieren.
3,05 g MgCl₂ (MG: 203,3) abwiegen und mit ca. 10 ml des Puffers mischen und steril filtriert wieder zu der Lösung hinzu geben.

Puffer 4, pH 8,0

1,21 g Tris (MG: 121,14)
0,37 g EDTA (MG: 372,3)
1000 ml Aqua bidest.

1x PBS + 5 mM MgCl₂

10 ml 10x PBS
0,5 ml 1 M MgCl₂
ad 100 ml Aqua bidest.
Nicht autoklavieren, MgCl₂ steril filtriert hinzu geben.

2x SSC + 5 mM EDTA-Na₂

50 ml 20x SSC
5 ml 0,5 M EDTA-Na₂
500 ml Aqua bidest.

0,2 % Glycin in 1x PBS

1 g Glycin
500 ml 1x PBS, pH 7,4

50x Denhardts

5 g Ficoll
5 g Polyvinylpyrrolidone
5 g BSA (bovines Serumalbumin)
500 ml Aqua bidest.
Aliquotieren und bei -20° C lagern.

20x Hybridisierungssalze

10 ml 0,5 M EDTA-Na₂, pH 8,0
10 ml 0,5 M PIPES, pH 7,0
30 ml 5 M NaCl

Dextransulfat

250 mg Dextransulfat
400 µl Aqua bidest./DEPC
Frisch ansetzen und im Wasserbad bei ca. 96 °C lösen.

ssDNA (Heringssperma-DNA)

In Originalpackung mit Puffer 4 (pH 8) in der Konzentration 10 mg/ml lösen.

RNA (Ribonukleinsäure)

In Originalpackung mit Aqua bidest./DEPC in der Konzentration 10 mg/ml lösen.

Prähybridisierungspuffer (PHB-Mix)

450 ml 20x SSC
675 ml 100% Formamid, deionisiert
150 ml 50 x Denhardts
210 ml Aqua bidest./DEPC
Ergibt 30 Aliquots zu je 49,5 ml, Lagerung bei -20 °C.
Pro Aliquot frisch zugeben:
0,5 ml ssDNA (5 min im Wasserbad auf 95 °C erhitzen, danach auf Eis lagern)
1,25 ml RNA

Hybridisierungspuffer (HB-Mix)

16 ml 100 % Formamid, deionisiert
8 ml 20x Hybridisierungssalze
3,2 ml 50x Denhardts
10 mg Heparin320 µl 10%iges Triton® X-100
Ergibt 40 Aliquots zu je 696 µl, bei -20° C lagern.
Pro Aliquot frisch zugeben:
18 µl RNA

20 µl ssDNA
80 µl gelöstes Dextransulfat
RNA-Sonde gemäß jeweiligem Protokoll

Nitroblau-Tetrazoliumchlorid (NBT)

Stammlösung (75 mg/ml)
1 g NBT
13,3 ml 70%iges Dimethylformamid (DMF; 30 ml Aqua bidest. + 70 ml DMF)
Nicht autoklavieren.

5-Brom-4-Chlor-3-Indolyl-Phosphat (X-Phosphat, BCIP)

500 mg X-Phosphat
10 ml 100%iges DMF
Nicht autoklavieren.

Farbreaktionslösung

Unter Lichtschutz frisch ansetzen.
225 µl NBT
175 µl X-Phosphat
12 mg Levamisol
50 ml Puffer 3

Proteinase K-Gebrauchslösung

1 ml 1 M Tris, pH 8,0
1 ml 0,1 M CaCl₂
ad 60ml Aqua bidest./DEPC
Bei 37 °C im Wasserbad zusammen vorinkubieren.
3 µl Proteinase K (Stocklösung 20 mg/ml) kurz vor Gebrauch dazugeben. Entspricht 1 µg pro ml Gebrauchslösung.

0,25 % Acetanhydrid (Aca) in 0,1 M Triethanolamin (TEA), pH 7,5

745 mg TEA
ad 50 ml Aqua bidest./DEPC
pH-Wert 7,5 mit 1-2 N HCl einstellen
125 µl Aca kurz vor Gebrauch zugeben und auf Magnetrührer gut rühren lassen.

6x SSC + 45 % Formamid

36 ml 20x SSC
54 ml 100% Formamid, nicht-deionisiert
30 ml Aqua bidest.

RNase-Lösung

20 ml 3 M NaCl
1,2 ml 1 M Tris, pH 8,0
240 µl 0,5 M EDTA, pH 8,0
ad 120 ml Aqua bidest.
Zusammen bei 37 °C im Wasserbad vorinkubieren.
15 µl RNase A und 10 µl RNase T kurz vor Gebrauch zugeben.

DIG-Antikörper-Lösung

31 µl NSS
94 µl 10%iges Triton® X-100
3 ml Puffer 1
Bei 37 °C im Wasserbad vorinkubieren.
15 µl Anti-DIG-Antikörper (1:200)

8.2 BEZUGSQUELLEN

Altromin Spezialfutter GmbH & Co. KG, Lage
Standarddiät Ratte/Maus Zucht (1310)

B. Braun Melsungen AG, Melsungen
Omnifix®-F Feindosierspritze (9161406V)
Sterican® Mix, stumpfe Kanüle ohne Anschliff, 21 G (9180109)

BDK Luft-und Reinraumtechnik GmbH; jetzt Weiss Pharmatechnik GmbH, Sonnenbühl-Genkingen
Laminar Flow Sicherheitswerkbank (BDK-SK1500)

Biomed Labordiagnostik GmbH, Oberschleißheim
Thermocycler 60

Biotrend Chemikalien GmbH, Köln
Kaninchen anti-Tyrosine Hydroxylase (TZ1010-0050)

Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf
Multicycler® PTC 200
GelBond® (863746)

BRAND GmbH + Co. KG, Wertheim
Parafilm® M Verschlussfolie (701605)

Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Ammoniaklösung ≥25%, reinst (5460.1)
Calciumchlorid Dihydrat ≥99 %, Ph.Eur., USP (T885.2)
Chloralhydrat ≥99,5 %, Ph.Eur., BP, USP (K318.2)
Chloroform ≥99 %, DAB, BP, reinst (6340.2)
Citronensäure ≥99,5%, p.a., ACS, wasserfrei (X863.2)
DAPI (4',6-diamino-2-phenylindole; 6335.1)
Deckgläser 20x20 mm (H873.2)
Deckgläser 24x32 mm (H877.2)
Diethylpyrocarbonat (DEPC; K028.2)
Dimethylformamid ≥99,5 %, zur Synthese (6251.1)
Ethanol vergällt ≥99,8%, mit ca. 1% MEK (K928.2)
Ethylendiamin-tetraessigsäure Dinatriumsalz Dihydrat (EDTA; X986.3)
Formaldehydlösung säurefrei ≥37%, für die Histologie (P733.3)
Formamid ≥99,5 %, p.a. (6749.1)
Formamid deionisiert ≥99,5 %, BioScience-Grade, RNase / DNase-frei (P040.1)
Heparin Natriumsalz (7692.1)
Kaliumchlorid (KCl) ≥99 %, Ph.Eur., USP, BP (P017.2)
Kaliumdihydrogenphosphat ≥99 %, p.a., ACS (3904.1)
Magnesiumchlorid Hexahydrat ≥99 %, p.a., ACS (2189.2)
Methanol Rotipuran® ≥99,9%, p.a., ACS, ISO (Art. 4627.3)
Natriumchlorid (NaCl) ≥99%, Ph.Eur., USP (P029.3)
Natriumhydrogencarbonat ≥99 %, Ph.Eur., reinst (8551.1)
Natriumhydrogenphosphat ≥99 %, p.a., ACS, wasserfrei (P030.2)
Natriumhydroxid ≥99 %, p.a., ISO, in Plätzchen (6771.1)
Natriumsulfat ≥99 % (8631.2)
Natriumtetraborat (8643.1)
Paraffin Roti®-Plast, für die Histologie (6642.5)
Propanol ≥99,5%, zur Synthese (9866.3)
Proteinase K lyophilisiert, ≥30 mAnson U/mg (7528.4)
RNase away® (A998.1)
Rotilabo®-Spritzenfilter 22 µm, CME, steril (KH54.1)
Salzsäure (HCl) rauchend 37 % (2607.2)
Triethanolamin (6300.1)
Tris, Pufferan® ≥99,9%, p.a. (4855.2)

Wasserstoffperoxid 30% Rotipuran® p.a., ISO, stabilisiert (8070.1)

Carl Zeiss West Germany, jetzt: Carl Zeiss Microscopy GmbH, Jena
Stereomikroskop (4772992)

Covance, Princeton, NJ, USA
Neuronal Class III beta-Tubulin (TUJ1) Rabbit Monoclonal Antibody, Purified (MRB-435P)

Dako A/S, Glostrup, Dänemark
Dako Pen (S2002)
Kaninchen anti-Glial Fibrillar Acidic Protein (Z0334)
Maus anti-Proliferating Cell Nuclear Antigen (M0879)
Maus anti-Vimentin (M0725)
Negative Control Rabbit Immunoglobulin Fraction (X0936)
Target Retrieval Solution Ready-to-Use (S1700)

EHRET Labor- und Pharmatechnik GmbH und Co.KG, Emmendingen; jetzt: ZOONLAB GmbH, Castrop-Rauxel
Bio. A.S.® Käfig Typ III (3010033)
Bio. A.S.® Filterdeckel Typ III(5010907)
Deckel mit Fallbügelschloss erhöhte Ausführung (für Käfig Typ IV; 40051)
Käfig Typ IV (40000-PC)
Gitterdeckel (für Käfig Typ III; 5023483)

EMD Millipore Corporation, Billerica, MA, USA; jetzt Merck KGaA (Merck Millipore), Darmstadt
Amicon® Ultra Centrifugal Filter Devices (UFC503096)
Cell culture inserts, 30 mm (PICM0RG50)
Maus anti-Neuronal Nuclei (NeuN) (MAB377)

Eppendorf AG, Hamburg
Zentrifuge (5415C)
DNA LoBind® Tubes, 1,5 ml (30108051)

Eurofins Genomics GmbH, Ebersberg
Primersynthese

Eurogentec, Seraing, Belgien
Synthese der 5'-FAM-3'-TAMRA-markierte TaqMan®-Sonden

Fermentas Life Sciences GmbH, St. Leon-Rot; Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA
dNTP Mix, 10 µM (R0192)
RiboLock™ RNase Inhibitor (E00382)

Fluka Feinchemikalien GmbH, Neu-Ulm; jetzt Sigma-Aldrich Co. LLC., St. Louis, MO, USA
Acetanhydrid (320102)
Dextransulfat (31395)

Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Zellkulturschale Durchmesser 35 mm 627160

Hamilton Bonaduz AG, Bonaduz, Schweiz über CS-Chromatographie Service GmbH, Langerwehe
Hamilton RN-Nadeln, 26 G, 5 mm, pst. 4 (Sonderanfertigung)
10 µl Microliter Spritze, Modell 701 RWSYR (7635-01)

Heraeus Instruments GmbH, Hanau
Zentrifuge Labofuge 400R

Invitrogen Corporation, Molecular Probes Camarillo, CA, USA; jetzt: Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA
Streptavidin HRPO Conugate (SA 1007)

Maus anti-Neuron Specific Enolase (18-0196)

Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc., West Grove, PA, USA

Ratte anti-Maus IgG (H+L; 415-005-166)

Maus Peroxidase anti-Peroxidase (223-005-024)

Bovines Serumalbumin (IgG-frei, Protease-frei; 001-000-162)

Ziege IgG anti-Kaninchen IgG (H+L), Cy2 (111-225-003)

Ziege IgG anti-Maus IgG (H+L), Cy3 (115-165-151)

Jena Bioscience GmbH, Jena

Taq Pol, thermostabile DNA Polymerase (PCR-202L)

Labnet International Inc., Edison, NJ, USA

AccuBlock™ Mini-Compact Dry Bath (D0100-230V)

Machery-Nagel GmbH & Co. KG, Düren

Filterpapier MN 615¼, Durchmesser 320 mm (531032)

Marabu GmbH & Co. KG, Tamm

MARABU Fixogum Montagekleber (4007751000743)

Merck KGaA (Merck Millipore), Darmstadt

Entellan® in Toluol (107960)

Natronlauge Titrisol® 1mol/l (1N; 1.09956.0001)

Papanicolaous Lösung 1b Hämatoxylinlösung S (1.09254.0500)

Salzsäure Titrisol® 1 mol/l (1N; 1.09970.0001)

Tri-Natriumcitrat (1.11037.1000)

Kaisers Glyceringelatine (109242)

Motic Deutschland GmbH, Wetzlar

Moticam 3 (1.100.600.100.621)

New Brunswick Scientific, Enfield, CT, USA; jetzt Eppendorf AG, Hamburg

Innova™ 2000 Platform Shaker (M1190-0002)

Nexttec GmbH, Leverkusen

nexttec™ clean columns (nexttec™ DNA isolation systems; 30.050)

Nikon GmbH, Düsseldorf

Inverses Mikroskop Eclipse TS100

Eclipse 80i

PAA Laboratories GmbH, Pasching, Austria

Donor Horse Serum (B15-023)

Goat Serum (B11-035)

Porcine Serum (B15-030)

Rat Serum (B11-037)

Fetal Calf Serum (A15-042)

Qiagen N.V., Venlo, Niederlande

QuantiTect® Reverse Transcription Kit (205313)

RNase-Free DNase Set (50; 79254)

RNeasy® Mini Kit (250; 74106)

Rotor-Gene® Probe PCR Kit (204374)

Rotor-Gene® Q (9001586)

R. Langenbrinck Labor- und Medizintechnik, Emmendingen

SuperFrost® Plus Objektträger (03-0060)

Roche Diagnostics Deutschland GmbH, Mannheim

Anti-digoxigenin-AP FAb fragments, 150 U (1093274)

DIG RNA Labeling Kit SP6/T7 (11175025910)
RNase A (1119915)
RNase T1 (10109193001)
T3 RNA Polymerase (11031163001)

Sakura Finetek Germany GmbH, Staufen

Tissue-Tek® O.C.T.™ Einbettmedium (4583)
Tissue-Tek® SCA™ Eindeckfilm (4770)
Tissue-Tek® TEC™ 5 Paraffinausgießstation mit Kü hplatte (5229)
Tissue-Tek® VIP™ 5 Jr. Gewebereinbettungsautomat (5905)
Tissue-Tek® Coverslipper (4765)

Sarstedt AG & Co., Nümbrecht

Biosphere® Filter Tips 0.5 - 20 µl (701.116.210)
Biosphere® Filter Tips 2 - 100 µl (70.760.212)
Biosphere® Filter Tips 2 - 200 µl (70.760.211)
Biosphere® Filter Tips 1250 µl extra long (701.186.210)
Röhre 13 ml 101x16,5 mm (60.540.014)
Röhre 15 ml 120x17mm (62.554.502)
Röhre 50 ml 114x28mm (62.547.254)
SafeSeal Reagiergefäß 1,5 ml (72.706)
SafeSeal Reagiergefäß 2 ml (72.695.500)
Zellkulturfflasche 25 cm² Kulturfläche (833.910.002)

Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA, USA

Ziege anti-Doublecortin (C-18; sc-8066)
Kaninchen anti-TrkA (763; sc-118)

SAV LP GmbH, Flintsbach a. Inn

Xylol reinst (XTR-10000-97-1)
Ethanol 96%, vergällt (ETO-10000-96-1)

Serva Electrophoresis GmbH, Frankfurt

Glycin, analytical grade (23390)
Triton® X-100 rein (37240)

Sigma-Aldrich Co. LLC., St. Louis, MO, USA

β-Mercaptoethanol (M6250)
Boric acid (B6768)
3,3'-Diaminobenzidine tetrahydrochloride hydrate≥96% (DAB; D5637)
Deoxyribonucleic acid from herring sperm, single-stranded for hybridization (D7290)
Ficoll 400 (F4375)
Imidazole puriss. p.a., ≥99,5% (GC; 56750)
Nitroblautetrazoliumchlorid (NBT; N6639)
Levamisol (Tetramisole hydrochloride) (L9756)
Lithiumchlorid (LiCl, 8 M; L7026)
Paraformaldehyd (158127)
Piperazin-N,N' bis[2-ethansulfat-Säure] (PIPES; P3768)
Poly-L-lysine hydrobromide, mol wt 30,000-70,000 (P2636)
Poly-L-lysine hydrobromide, mol wt 70,000-150,000 (P1274)
Polyvinylpyrrolidone (P5288)
Ribonucleic acid from calf liver, Type IV (R7250)
Sheep Serum (S2263)
5-Brom-4-Chlor-3-Indolylphosphat (X-Phosphat; B6777)

Süsse Labortechnik GmbH & Co. KG, Gudensberg

Süsse Objektträger (11238A)

Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA (früher: Gibco®, Invitrogen™, Life Technologies™, Carlsbad, CA, USA)

Collagenase from Clostridium histolyticum (C0130)
 Dispase II (D4693)
 Deoxyribonuclease II from bovine spleen (D8764)
 Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM), high glucose, pyruvate (41966029)
 Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM), low glucose, pyruvate (31885023)
 Neurobasal®-A (1x) Medium (10888022)
 B-27® supplement (50x; custom; 6080085SA)
 GlutaMAX™ supplement (35050061)
 Penicillin-Streptomycin (10,000 U/ml; 15140-122)
 Gentamicin (50mg/ml; 15750-060)
 Nanodrop 2000 Spektralphotometer
 Färbeautomat Microm HMS 740
 TOPO TA Cloning® Kit for Sequencing (K4575-01)
 TRIzol® Reagent (15596-026)

Thermo Scientific (Thermo Shandon Limited), Runcorn, UK; jetzt: Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA

Shandon Coverplate™ (72110017) cycler
 Cassette Rack Assy (73310017)

Vector Laboratories, Inc., Burlingame, CA, USA

Avidin-Biotin-Komplex: Vectastain® ABC-Kit Peroxidase Standard (PK-4000)
 Ziege anti-Kaninchen IgG (H+L), biotinyliert (BA-1000)
 Pferd anti-Ziege IgG (H+L), biotinyliert (BA-9500)
 Pferd anti-Maus IgG (H+L), biotinyliert (BA-2000)

Wako Chemicals USA, Inc., Richmond, VA, USA

Ziege anti-Olfactory Marker Protein (544-10001-WAKO)

8.3 TABELLEN

8.3.1 Charakterisierung des olfaktorischen Epithel des Pferdes

Tab. 19: Daten zu den in die Auswertung eingeflossenen Pferde

Sektionsnummer	Rasse	Alter	Geschlecht	Todesursache
S630/11	Warmblut	20	Wallach	Euthanasie (Anschoppung und Ruptur des Colon ascendens)
S691/11	Warmblut	21	Wallach	Euthanasie (Spondylosen, Knorpeldegeneration und Quetschung Bandscheibe im Bereich Hals- und Brustwirbelsäule)
S1498/13	Kaltblut	3	Wallach	Euthanasie (Phlegmone und Myositis im ventralen Halsbereich, transmurale Thrombophlebitis)
S1612/13	Warmblut	5	Wallach	Euthanasie (Fraktur Tibia)
S1492/13	Pony	10	Stute	Euthanasie (Blutungsanämie und Hämaskos nach Kolikoperation)

Tab. 20: Prozentualer Anteil des olfaktorischen Epithels am gesamten Epithel in der Pferdenase

Querschnitt	Lokalisation	Mittelwert	SD	Median
A	1	60	34,6	80
	2	80	14,1	80
	3	80	14,1	80
	4	72	17,9	80
	5	0	0,0	0
B	1	4	8,9	0
	2	68	17,9	80
	3	64	8,9	60
	4	56	8,9	60
	5	0	0,0	0
C	1	0	0,0	0
	2	32	26,8	20
	3	36	26,1	40
	4	40	24,5	40
	5	2	4,5	0
D	1	0	0,0	0
	2	8	17,9	0
	3	12	11,0	20
	4	8	17,9	0
	5	0	0,0	0

Lokalisationen aufgeteilt nach Querschnitten A - M, Riechepithel nur nachweisbar in A - D; Lokalisation 1: Nasenseptum, 2: dorsaler Anteil Nasenmuscheln, 3: mittlerer Anteil Nasenmuscheln, 4: ventraler Anteil Nasenmuscheln, 5: Begrenzung der Nasenhöhle; Mittelwert: arithmetrischer Mittelwert aller 5 Pferde; SD: Standardabweichung

Tab. 21: Prozentualer Anteil der Typen A und B des olfaktorischen Epithels am gesamten Epithel in der Pferdenase

Querschnitt	Lokalisation	Mittelwert Typ A / Typ B	SD Typ A / Typ B	Median Typ A / Typ B
A	1	44 / 16	28,8 / 11,4	60 / 20
	2	60 / 20	14,1 / 0	60 / 20
	3	58 / 22	14,8 / 4,5	60 / 20
	4	50 / 22	17,3 / 4,5	60 / 20
	5	0 / 0	0 / 0	0 / 0
B	1	2 / 2	4,5 / 4,5	0 / 0
	2	44 / 24	16,7 / 8,9	40 / 20
	3	42 / 22	13 / 8,4	40 / 20
	4	30 / 26	7,1 / 5,5	30 / 30
	5	0 / 0	0 / 0	0 / 0
C	1	0 / 0	0 / 0	0 / 0
	2	20 / 12	20 / 11	10 / 10
	3	14 / 22	15,2 / 13	10 / 30
	4	18 / 22	14,8 / 11	20 / 20
	5	0 / 2	0 / 4,5	0 / 0
D	1	0 / 0	0 / 0	0 / 0
	2	2 / 6	4,5 / 13,4	0 / 0
	3	4 / 8	5,5 / 8,4	0 / 10
	4	2 / 6	4,5 / 13,4	0 / 0
	5	0 / 0	0 / 0	0 / 0

Lokalisationen aufgeteilt nach Querschnitten A - M, Riechepithel nur nachweisbar in A - D; Lokalisation 1: Nasenseptum, 2: dorsaler Anteil Nasenmuscheln, 3: mittlerer Anteil Nasenmuscheln, 4: ventraler Anteil Nasenmuscheln, 5: Begrenzung der Nasenhöhle; Mittelwert: arithmetrischer Mittelwert aller 5 Pferde; SD: Standardabweichung

Tab. 22: Immunhistologischer Nachweis von OMP im olfaktorischen Epithel des Pferdes

Querschnitt	Lokalisation	Mittlerer Score OMP	Minimaler / maximaler Score
A	1	2,2	0 / 3
	2	2,8	2 / 3
	3	2,6	2 / 3
	4	2,8	2 / 3
	5	0	0 / 0
B	1	0,4	0 / 2
	2	2,4	2 / 3
	3	2,6	2 / 3
	4	2,2	2 / 3
	5	0	0 / 0
C	1	0	0 / 0
	2	1,6	0 / 3
	3	1,6	0 / 3
	4	2	1 / 3
	5	0,2	0 / 1
D	1	0	0 / 0
	2	0,4	0 / 2
	3	0,8	0 / 2
	4	0,4	0 / 2
	5	0	0 / 0

Lokalisationen aufgeteilt nach Querschnitten A - M, Riechepithel nur nachweisbar in A - D; OMP: *Olfactory marker protein*; Lokalisation 1: Nasenseptum, 2: dorsaler Anteil Nasenmuscheln, 3: mittlerer Anteil Nasenmuscheln, 4: ventraler Anteil Nasenmuscheln, 5: Begrenzung der Nasenhöhle; mittlerer Score: arithmetischer Mittelwert aller 5 Pferde

Tab. 23: Immunhistologischer Nachweis von DCX im olfaktorischen Epithel des Pferdes

Querschnitt	Lokalisation	Mittlerer Score DCX	Minimaler / maximaler Score
A	1	1,2	0 / 2
	2	2	1 / 3
	3	1,8	1 / 2
	4	1,8	1 / 2
	5	0	0 / 0
B	1	0,2	0 / 1
	2	2,2	1 / 3
	3	2,2	1 / 3
	4	1,6	1 / 2
	5	0	0 / 0
C	1	0	0 / 0
	2	1,6	0 / 3
	3	1,8	0 / 3
	4	2	1 / 3
	5	0,2	0 / 1
D	1	0	0 / 0
	2	0,4	0 / 2
	3	0,8	0 / 2
	4	0,4	0 / 2
	5	0	0 / 0

Lokalisationen aufgeteilt nach Querschnitten A - M, Riechepithel nur nachweisbar in A - D; DCX: *Doublecortin*; Lokalisation 1: Nasenseptum, 2: dorsaler Anteil Nasenmuscheln, 3: mittlerer Anteil Nasenmuscheln, 4: ventraler Anteil Nasenmuscheln, 5: Begrenzung der Nasenhöhle; mittlerer Score: arithmetischer Mittelwert aller 5 Pferde

Tab. 24: Immunhistologischer Nachweis von PCNA im olfaktorischen Epithel des Pferdes

Querschnitt	Lokalisation	Mittlerer Score PCNA	Minimaler / maximaler Score
A	1	0,2	0 / 1
	2	1	0 / 2
	3	1	0 / 2
	4	0,8	0 / 2
	5	0	0 / 0
B	1	0	0 / 0
	2	0,8	0 / 2
	3	0,6	0 / 1
	4	0,8	0 / 2
	5	0	0 / 0
C	1	0	0 / 0
	2	1	0 / 2
	3	1	0 / 2
	4	1	2 / 2
	5	0	0 / 0
D	1	0	0 / 0
	2	0,2	0 / 1
	3	0,2	0 / 1
	4	0,2	0 / 1
	5	0	0 / 0

Lokalisationen aufgeteilt nach Querschnitten A - M, Riechepithel nur nachweisbar in A - D; PCNA: *Proliferating cell nuclear antigen*; Lokalisation 1: Nasenseptum, 2: dorsaler Anteil Nasenmuscheln, 3: mittlerer Anteil Nasenmuscheln, 4: ventraler Anteil Nasenmuscheln, 5: Begrenzung der Nasenhöhle; mittlerer Score: arithmetrischer Mittelwert aller 5 Pferde

Tab. 25: Immunhistologischer Nachweis von TrkA im olfaktorischen Epithel des Pferdes

Querschnitt	Lokalisation	Mittlerer Score PCNA	Minimaler / maximaler Score
A	1	1,6	0 / 3
	2	2	1 / 3
	3	2,2	1 / 3
	4	2,4	1 / 3
	5	0	0 / 0
B	1	0,2	0 / 1
	2	2,2	1 / 3
	3	2	1 / 3
	4	2	1 / 3
	5	0	0 / 0
C	1	0	0 / 0
	2	1,6	0 / 3
	3	1,8	0 / 3
	4	2,2	1 / 3
	5	0,2	0 / 1
D	1	0	0 / 0
	2	0,4	0 / 2
	3	1	0 / 2
	4	0,4	0 / 2
	5	0	0 / 0

Lokalisationen aufgeteilt nach Querschnitten A - M, Riechepithel nur nachweisbar in A - D; TrkA: Tyrosinkinase-Rezeptor-A; Lokalisation 1: Nasenseptum, 2: dorsaler Anteil Nasenmuscheln, 3: mittlerer Anteil Nasenmuscheln, 4: ventraler Anteil Nasenmuscheln, 5: Begrenzung der Nasenhöhle; mittlerer Score: arithmetischer Mittelwert aller 5 Pferde

Tab. 26: Rangkorrelationskoeffizient nach Spearman für die Expression der immunhistologischen Marker im Bezug auf die Epitheltypen

Marker	Epitheltyp	r_s
OMP	A	0,9492
	B	0,8461
DCX	A	0,8788
	B	0,8758
PCNA	A	0,6086
	B	0,6838
TrkA	A	0,7841
	B	0,8795

OMP: *Olfactory marker protein*; DCX: *Doublecortin*; PCNA: *Proliferating cell nuclear antigen*; TrkA: *Tyrosinkinase-Rezeptor-A*; r_s : Rangkorrelationskoeffizient nach Spearman

8.3.2 Experimentelle intranasale Infektion von Lewis-Ratten

Tab. 27: Score Sheet zur Bewertung der Lewis-Ratten nach intranasaler BDV-Infektion

Blatt 1 Ratte ID:				Versuchsbeginn (Datum/Uhrzeit):				Ausgangsgewicht:				Geburtsdatum:					
Eingriff																	
Verlauf	Tag 0	Tag 1	Tag 2	Tag 3	Tag 4	Tag 5	Tag 6	Tag 7	Tag 8	Tag 9	Tag 10	Tag 11	Tag 12	Tag 13	Tag 14	Tag 15	Tag 16
Kriterium																	
Körpergewicht																	
Allgemeinzustand																	
Spontanverhalten																	
SUMME Score																	
Bemerkung																	
Untersucher																	

Tab. 28: Bewertungskriterien für die Ratten nach intranasaler BDV-Infektion

Score Sheet Infektion Ratten BDV Gruppen 2-9					
Punktewertung	0	1	5	10	20
Körpergewicht <small>(Beurteilt wird der Gewichtsverlust innerhalb von 3 Tagen; Bestimmung alle 3-4 Tage, ab 14 dpi alle 2 Tage)</small>	0-5% Verlust	5-10% Verlust	10-20% Verlust	20-25% Verlust	>25% Verlust
Allgemeinzustand <small>(Tägliche Bewertung)</small>	Fell glatt, glänzend; Körperöffnungen sauber; Augen klar, glänzend	Fell geringgradig gesträubt, verminderte oder übersteigerte Körperpflege	Fell stumpf, ungeordnet; un gepflegte Körperöffnungen; Augen trüb; erhöhter Muskeltonus	Fokal verklebtes Fell; unnormale Haltung; Augen trüb; hoher Muskeltonus	Struppiges, rauhes Fell; aufgekrümmter Rücken; abnorme Kopf- und Gliedmaßenhaltung
Spontanverhalten <small>(Tägliche Bewertung)</small>	Normales Verhalten (Schlafen, Reaktion auf Anblasen und Berührung, Neugier, Sozialkontakte)	Geringe Abweichungen vom Normalverhalten	gesteigerte Aktivität, Nervosität	Selbstisolation, aggressives Verhalten gegenüber Käfiggenossen, Koordinationsstörungen, ataktische Bewegungen	Paralyse, Lethargie, Somnolenz, Desorientierung, Ataxie

Tab. 29: Zu ergreifende Maßnahmen nach erfolgreichem Scoring

Die obigen Kriterien führen, für jedes Versuchstier über den gesamten Versuchszeitraum individuell bestimmt, zum Abbruch des Versuchs und zur Euthanasie. Die Tiere werden täglich zur gleichen Tageszeit kontrolliert. Das Wiegen findet alle 3-4 Tage (Gruppen 2-9). Die Intervalle werden an den kritischen Untersuchungszeitpunkten (ab 14 dpi) angepasst.

Nach der intranasalen Applikation von Flüssigkeiten wird bei der täglichen Kontrolle vor allem auch auf eine Änderung des Atemtyps sowie Husten geachtet um sicher zu stellen, dass keine Flüssigkeit aspiriert wurde.

Bewertung und Maßnahmen:

Punktesumme	Belastungsgrad	Erläuterung
0	0	Keine Belastung
1-9	1	Geringe Belastung, sorgfältig weiter beobachten
10-19	2	Mittelgradige Belastung, ggf. tierärztliche Versorgung einleiten Sollte der Einzelscore über 2 Tage lang bei 10 liegen, wird Rücksprache mit dem Tierarzt/Leiter die Euthanasie durchgeführt.
20 oder höher (max. 60 möglich)	3	Hochgradige Belastung, Euthanasie bzw. Rücksprache mit Leiter/Tierarzt

Gesamtscore 20 oder höher (max. 60 möglich)

Die Tiere werden beim Erreichen eines Einzelscores von 20 euthanasiert, d.h. die Bewertung in einem der folgenden Kriterien „Körpergewicht“, „Allgemeinzustand“, sowie „Spontanverhalten“ mit einem Score 20 reicht zur Euthanasie aus. Bei einem Gesamtscore (durch Addition von Befunden an den Scores 1, 5 und 10) von 20 oder mehr (max. 60 möglich), wird der Tierarzt/Projektleiter kontaktiert und es erfolgt in Absprache die Euthanasie.

Tab. 30: Nachweis von BDV-N im olfaktorischen Epithel der Ratte

Zeit nach Infektion	Zelltyp oder Struktur	Mittlerer Score	Minimaler / maximaler Score
3 hpi	Adulte Neurone	0	0 / 0
	Juvenile Neurone	0	0 / 0
	Stützzellen	0	0 / 0
	Prolif. Basalzellen	0	0 / 0
	Horiz. Basalzellen	0	0 / 0
	Nervenfasern	0	0 / 0
	Olf. Hüllzellen	0	0 / 0
18 hpi	Adulte Neurone	0	0 / 0
	Juvenile Neurone	0	0 / 0
	Stützzellen	0	0 / 0
	Prolif. Basalzellen	0	0 / 0
	Horiz. Basalzellen	0	0 / 0
	Nervenfasern	0	0 / 0
	Olf. Hüllzellen	0	0 / 0
1 dpi	Adulte Neurone	0	0 / 0
	Juvenile Neurone	0	0 / 0
	Stützzellen	0	0 / 0
	Prolif. Basalzellen	0	0 / 0
	Horiz. Basalzellen	0	0 / 0
	Nervenfasern	0	0 / 0
	Olf. Hüllzellen	0	0 / 0
2 dpi	Adulte Neurone	0	0 / 0
	Juvenile Neurone	0	0 / 0
	Stützzellen	0	0 / 0
	Prolif. Basalzellen	0	0 / 0
	Horiz. Basalzellen	0	0 / 0
	Nervenfasern	0	0 / 0
	Olf. Hüllzellen	0	0 / 0

Fortsetzung von Tab. 30

Zeit nach Infektion	Zelltyp oder Struktur	Mittlerer Score	Minimaler / maximaler Score
4 dpi	Adulte Neurone	0,4	0 / 1
	Juvenile Neurone	0,2	0 / 1
	Stützzellen	0	0 / 0
	Prolif. Basalzellen	0	0 / 0
	Horiz. Basalzellen	0	0 / 0
	Nervenfasern	0	0 / 0
	Olf. Hüllzellen	0	0 / 0
7 dpi	Adulte Neurone	0,4	0 / 1
	Juvenile Neurone	0	0 / 0
	Stützzellen	0	0 / 0
	Prolif. Basalzellen	0,2	0 / 1
	Horiz. Basalzellen	0	0 / 0
	Nervenfasern	0	0 / 0
	Olf. Hüllzellen	0	0 / 0
14 dpi	Adulte Neurone	2,6	2 / 3
	Juvenile Neurone	2	1 / 3
	Stützzellen	1	0 / 2
	Prolif. Basalzellen	1	0 / 2
	Horiz. Basalzellen	0,8	0 / 2
	Nervenfasern	1,8	1 / 2
	Olf. Hüllzellen	1,8	1 / 2
21 dpi	Adulte Neurone	3	3 / 3
	Juvenile Neurone	2,5	2 / 3
	Stützzellen	2,5	2 / 3
	Prolif. Basalzellen	2,5	2 / 3
	Horiz. Basalzellen	1,5	1 / 2
	Nervenfasern	3	3 / 3
	Olf. Hüllzellen	3	3 / 3

hpi: *hours post infection*; dpi: *days post infection*; mittlerer Score: arithmetrischer Mittelwert aller untersuchten Tiere

Tab. 31: Exakter Kruskal-Wallis Test für den Nachweis von BDV-N im olfaktorischen Epithel der Ratte im Bezug auf die untersuchten Zellen und Strukturen

Zelltyp / Struktur	p-Werte		
	Antigen	genomische RNA	mRNA
Adulte Neurone	<0,0001	<0,0001	<0,0001
Juvenile Neurone	<0,0001	<0,0001	<0,0001
Stützzellen	0,0001	-	-
Proliferierende Basalzellen	0,0002	-	-
Horizontale Basalzellen	0,0016	-	-
Nervenfasern	<0,0001	0,0031	0,0014
olfaktorische Hüllzellen	<0,0001	<0,0001	0,0016

Tab. 32: Rangkorrelationskoeffizient nach Spearman für den Nachweis von BDV-N im olfaktorischen Epithel der Ratte im Bezug auf die untersuchten Zellen und Strukturen

Zelltyp / Struktur	r_s		
	Antigen	genomische RNA	mRNA
Adulte Neurone	0,7563	0,7657	0,7954
Juvenile Neurone	0,6813	0,7257	0,6817
Stützzellen	0,5762	-	-
Proliferierende Basalzellen	0,6007	-	-
Horizontale Basalzellen	0,5157	-	-
Nervenfasern	0,6866	0,5642	0,5171
olfaktorische Hüllzellen	0,6866	0,705	0,5146

r_s : Rangkorrelationskoeffizient nach Spearman

Tab. 33: Nachweis der viralen genomischen RNA im olfaktorischen Epithel der Ratte

Zeit nach Infektion	Zelltyp oder Struktur	Mittlerer Score	Minimaler / maximaler Score
3 hpi	Adulte Neurone	0	0 / 0
	Juvenile Neurone	0	0 / 0
	Stützzellen	0	0 / 0
	Prolif. Basalzellen	0	0 / 0
	Horiz. Basalzellen	0	0 / 0
	Nervenfasern	0	0 / 0
	Olf. Hüllzellen	0	0 / 0
18 hpi	Adulte Neurone	0	0 / 0
	Juvenile Neurone	0	0 / 0
	Stützzellen	0	0 / 0
	Prolif. Basalzellen	0	0 / 0
	Horiz. Basalzellen	0	0 / 0
	Nervenfasern	0	0 / 0
	Olf. Hüllzellen	0	0 / 0
1 dpi	Adulte Neurone	0	0 / 0
	Juvenile Neurone	0	0 / 0
	Stützzellen	0	0 / 0
	Prolif. Basalzellen	0	0 / 0
	Horiz. Basalzellen	0	0 / 0
	Nervenfasern	0	0 / 0
	Olf. Hüllzellen	0	0 / 0
2 dpi	Adulte Neurone	0	0 / 0
	Juvenile Neurone	0	0 / 0
	Stützzellen	0	0 / 0
	Prolif. Basalzellen	0	0 / 0
	Horiz. Basalzellen	0	0 / 0
	Nervenfasern	0	0 / 0
	Olf. Hüllzellen	0	0 / 0

Fortsetzung von Tab. 33

Zeit nach Infektion	Zelltyp oder Struktur	Mittlerer Score	Minimaler / maximaler Score
4 dpi	Adulte Neurone	0	0 / 1
	Juvenile Neurone	0	0 / 1
	Stützzellen	0	0 / 0
	Prolif. Basalzellen	0	0 / 0
	Horiz. Basalzellen	0	0 / 0
	Nervenfasern	0	0 / 0
	Olf. Hüllzellen	0	0 / 0
7 dpi	Adulte Neurone	0,8	0 / 2
	Juvenile Neurone	0,6	0 / 2
	Stützzellen	0	0 / 0
	Prolif. Basalzellen	0	0 / 0
	Horiz. Basalzellen	0	0 / 0
	Nervenfasern	0,4	0 / 1
	Olf. Hüllzellen	0,2	0 / 1
14 dpi	Adulte Neurone	2	2 / 2
	Juvenile Neurone	1	1 / 1
	Stützzellen	0	0 / 0
	Prolif. Basalzellen	0	0 / 0
	Horiz. Basalzellen	0	0 / 0
	Nervenfasern	0,4	0 / 1
	Olf. Hüllzellen	1,6	1 / 2
21 dpi	Adulte Neurone	2	2 / 2
	Juvenile Neurone	1,5	1 / 2
	Stützzellen	0	0 / 0
	Prolif. Basalzellen	0	0 / 0
	Horiz. Basalzellen	0	0 / 0
	Nervenfasern	1,5	1 / 2
	Olf. Hüllzellen	1,5	1 / 2

hpi: *hours post infection*; dpi: *days post infection*; mittlerer Score: arithmetrischer Mittelwert aller untersuchten Tiere

Tab. 34: Nachweis der BDV-N mRNA im olfaktorischen Epithel der Ratte

Zeit nach Infektion	Zelltyp oder Struktur	Mittlerer Score	Minimaler / maximaler Score
3 hpi	Adulte Neurone	0	0 / 0
	Juvenile Neurone	0	0 / 0
	Stützzellen	0	0 / 0
	Prolif. Basalzellen	0	0 / 0
	Horiz. Basalzellen	0	0 / 0
	Nervenfasern	0	0 / 0
	Olf. Hüllzellen	0	0 / 0
18 hpi	Adulte Neurone	0	0 / 0
	Juvenile Neurone	0	0 / 0
	Stützzellen	0	0 / 0
	Prolif. Basalzellen	0	0 / 0
	Horiz. Basalzellen	0	0 / 0
	Nervenfasern	0	0 / 0
	Olf. Hüllzellen	0	0 / 0
1 dpi	Adulte Neurone	0	0 / 0
	Juvenile Neurone	0	0 / 0
	Stützzellen	0	0 / 0
	Prolif. Basalzellen	0	0 / 0
	Horiz. Basalzellen	0	0 / 0
	Nervenfasern	0	0 / 0
	Olf. Hüllzellen	0	0 / 0
2 dpi	Adulte Neurone	0	0 / 0
	Juvenile Neurone	0	0 / 0
	Stützzellen	0	0 / 0
	Prolif. Basalzellen	0	0 / 0
	Horiz. Basalzellen	0	0 / 0
	Nervenfasern	0	0 / 0
	Olf. Hüllzellen	0	0 / 0

Fortsetzung von Tab. 34

Zeit nach Infektion	Zelltyp oder Struktur	Mittlerer Score	Minimaler / maximaler Score
4 dpi	Adulte Neurone	0,8	0 / 2
	Juvenile Neurone	0	0 / 1
	Stützzellen	0	0 / 0
	Prolif. Basalzellen	0	0 / 0
	Horiz. Basalzellen	0	0 / 0
	Nervenfasern	0	0 / 0
	Olf. Hüllzellen	0	0 / 0
7 dpi	Adulte Neurone	1	0 / 2
	Juvenile Neurone	0	0 / 2
	Stützzellen	0	0 / 0
	Prolif. Basalzellen	0	0 / 0
	Horiz. Basalzellen	0	0 / 0
	Nervenfasern	0	0 / 0
	Olf. Hüllzellen	0	0 / 0
14 dpi	Adulte Neurone	2	1 / 3
	Juvenile Neurone	1,6	1 / 3
	Stützzellen	0	0 / 0
	Prolif. Basalzellen	0	0 / 0
	Horiz. Basalzellen	0	0 / 0
	Nervenfasern	0,6	0 / 2
	Olf. Hüllzellen	1	0 / 3
21 dpi	Adulte Neurone	2,5	2 / 3
	Juvenile Neurone	2	1 / 3
	Stützzellen	0	0 / 0
	Prolif. Basalzellen	0	0 / 0
	Horiz. Basalzellen	0	0 / 0
	Nervenfasern	1,5	1 / 2
	Olf. Hüllzellen	1,5	1 / 2

hpi: *hours post infection*; dpi: *days post infection*; mittlerer Score: arithmetrischer Mittelwert aller untersuchten Tiere

Tab. 35: Anzahl PCNA-positiver Basal- und Stützzellen der BDV- und Mock-infizierten Tiere

Zeit nach Infektion	Gruppe	Zelltyp	Mittelwert	Standardabweichung
2 dpi	BDV	Basalzellen	9,47	3,454
		Stützzellen	1,77	0,511
	Mock	Basalzellen	12,3	2,404
		Stützzellen	2,58	0,884
4 dpi	BDV	Basalzellen	11,77	0,907
		Stützzellen	3,3	0,087
	Mock	Basalzellen	9,48	1,520
		Stützzellen	2,58	0,601
7 dpi	BDV	Basalzellen	11,35	0,433
		Stützzellen	3,25	0,872
	Mock	Basalzellen	11,55	0,495
		Stützzellen	2,375	0,177

PCNA: Proliferating cell nuclear antigen; dpi: days post infection; arithmetrischer Mittelwert

8.3.3 Dissoziationskultur des olfaktorischen Epithels

Tab. 36: Prozentualer Anteil der untersuchten Zelltypen des olfaktorischen Epithels an Gesamtzellzahl

Zeit in Kultur	Olfaktorische Neurone			Olfaktorische Hüllzellen		
	Mittelwert	Min / Max	SD	Mittelwert	Min / Max	SD
4 h	33	25,7 / 45,1	8,667	9,3	6,5 / 10,5	2,053
24 h	27,3	25,5 / 28,7	1,604	13,5	11 / 16,8	1,266
48 h	18,1	15,9 / 19,8	1,955	10,1	8,2 / 11,8	1,159
4 d	7,7	5,3 / 11,7	3,233	12,2	6,3 / 17,1	5,408
7 d	5,8	4,6 / 7,8	1,442	7,8	5,6 / 9	0,624

h: Stunden; d: Tage; Min / Max: minimaler / maximaler Wert; SD: Standardabweichung; arithmetrischer Mittelwert

Tab. 37: Prozentualer Anteil der infizierten Zellen nach BDV-Infektion der Dissoziationskultur des olfaktorischen Epithels

Zeit nach Infektion	Mittelwert	Min / Max	SD
4 dpi	10,7	10 / 11	0,577
7 dpi	19	12 / 23	6,083
10 dpi	23	16 / 29	6,557
14 dpi	29	25 / 36	6,083

dpi: *days post infection*; Min / Max: minimaler / maximaler Wert; SD: Standardabweichung; arithmetrischer Mittelwert

8.3.4. Co-Kultur aus olfaktorischem Epithel und olfaktorischen Hüllzellen

Tab. 38: Nachweis BDV-N-spezifischer normalisierter Kopienzahlen der genomischen RNA und der mRNA der Co-Kultur aus olfaktorischem Epithel und olfaktorischen Hüllzellen

Kultur	Zeit nach Infektion	RNA	Mittelwert	Quotient gRNA / mRNA
Olfaktorisches Epithel	4 dpi	gRNA	1,90973359	1:0,25
		mRNA	0,48048896	
	7 dpi	gRNA	0,9761562	1:0,38
		mRNA	0,36687804	
Olfaktorische Hüllzellen	4 dpi	gRNA	94,2336298	1:1,02
		mRNA	96,1290512	
	7 dpi	gRNA	75,637407	1:1,48
		mRNA	111,610151	
Co-Kultur 3:1 (OE:OEC)	4 dpi	gRNA	2,15446375	1:1,45
		mRNA	3,11389238	
	7 dpi	gRNA	3,57900901	1:0,94
		mRNA	3,35464181	
Co-Kultur 1:1 (OE:OEC)	4 dpi	gRNA	5,2975368	1:1,24
		mRNA	6,54344065	
	7 dpi	gRNA	7,91883923	1:0,95
		mRNA	7,52007963	

dpi: *days post infection*; OE: olfaktorisches Epithel OEC: olfaktorische Hüllzellen; geometrischer Mittelwert; Normalisierung: Kopienzahlen BDV/Kopienzahlen GAPDH

8.4 ABKÜRZUNGEN

Abb.	Abbildung
ABBV	<i>aquatic bird bornavirus</i>
ABV-MALL	<i>avian bornavirus MALL</i>
Aca	Acetanhydrid
Aqua bidest.	<i>Aqua bidestillata</i>
Aqua dest.	<i>Aqua destillata</i>
as	<i>antisense</i>
BCIP	5-Brom-4-Chlor-3-Indolyl-Phosphat
BD	<i>Borna disease</i> , Bornasche Krankheit
BDV	<i>Borna disease virus</i> , Virus der Bornaschen Krankheit
BDV-GP	BDV-Glykoprotein
BDV-L	RNA-abhängige RNA Polymerase des BDV
BDV-M	BDV-Matrixprotein
BDV-N	BDV-Nukleoprotein
BDV-P	BDV-Phosphoprotein
BDV-X	BDV-X-Protein
BDV, BoDV	<i>Borna disease virus</i>
bp	Basenpaare
BSA	bovines Seumalbumin
CAECAM1a	<i>Carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 1a</i>
CAR	Coxsackievirus-Adenovirus-Rezeptor
CAV-2	Canines Adenovirus-2
cDNA	<i>complementary DNA</i> , komplementäre DNA
CDV	<i>Canine distemper virus</i>
CnBV	<i>canary bornavirus</i>
cRNA	<i>complementary RNA</i> , komplementäre RNA
CSF	Cerebrospinalflüssigkeit
Ct	<i>threshold cycle</i>
DAB	3,3'-Diaminobenzidin-Tetrahydrochlorid-Lösung
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DCX	<i>Doublecortin</i>
DIG	Digoxigenin
DIV	<i>days in vitro</i> , Tage in Kultur
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMF	Dimethylformamid
DNA	<i>deoxyribonucleic acid</i> , Desoxyribonukleinsäure
dpi	<i>days post infection</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGFR	<i>epidermal growth factor receptor</i>
EsBV	<i>estrildid finch bornavirus</i>
FCS	<i>fetal calf serum</i> , fetales Kälberserum
FIV	Felines Immundefizienz-Virus
g	Gramm
x g	Gravitation
GAP43	<i>growth-associated phosphoprotein 43</i>
GAPDH	Glyceraldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
GaVV	<i>Gaboon viper virus</i>
GFAP	<i>glial fibrillary acidic protein</i> , saures Gliafaserprotein
GLUT1	Glukosetransporter 1
GOI	<i>gene of interest</i>
gRNA	genomische RNA
H&E	Hämatoxylin und Eosin-Färbung
HB-Mix	Hybridisierungs-Mix
HCl	Salzsäure
HIV	Humanes Immundefizienz-Virus
hpi	<i>hours post infection</i>
HSV	Herpes simplex Virus

HTLV-1	Humanes T-lymhotropes Virus-1
i.c.	intracerebral
ICAM-1	Intercellular adhesion molecule-1
IFN γ	Interferon gamma
IHC	<i>immunohistochemistry</i> , Immunhistologie
IL	Interleukin
i.n.	intranasal
IRCs	<i>inter-run calibrators</i>
ISH	<i>In-situ</i> -Hybridisierung
IVCs	<i>individually ventilated cages</i> , Einzelbelüftete Käfige
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
l	Liter
leRNA	<i>leader</i> -haltige BDV +ssRNA
LGSV	<i>Loveridge's garter snake virus</i>
M	Molarität
MCP	<i>membrane cofactor protein</i>
MHC	<i>major histocompatibility complex</i> , Haupthistokompatibilitätskomplex
MHV	Maus Hepatitis Virus
min	Minuten
ml	Milliliter
mRNA	<i>messenger RNA</i>
MuBV	<i>munia bornavirus</i>
MVV	Maedi-Visna-Virus
μ l	Mikroliter
N	Normalität
NaOH	Natronlauge
NBT	Nitroblau-Tetrazoliumchlorid
NCAM	<i>neural cell adhesion molecule</i>
NES	<i>nuclear export signal</i>
NGF	<i>nerve growth factor</i>
NLS	<i>nuclear localization signal</i>
NNS	<i>non-segmented negative strand</i> , nichtsegmentierter Negativstrang
NSE	neuronenspezifische Enolase
NSS	neutrales Schafserum
NTC	<i>no template control</i> , PCR-Negativkontrolle
OMP	<i>Olfactory marker protein</i>
ORF	<i>open reading frame</i> , offenes Leseraster
PaBV	<i>parrot bornavirus</i>
PBS	phosphate buffered saline, phosphatgepufferte Kochsalzlösung
PCNA	<i>Proliferating cell nuclear antigen</i>
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> , Polymerase-Kettenreaktion
PDD	<i>proventricular dilatation disease</i> , neuropathische Drüsenmagenerweiterung
PFA	Paraformaldehyd
PGP9.5	<i>protein gene product 9.5</i>
PHB-Mix	Prähybridisierungs-Mix
p.i.	<i>post infectionem</i> , nach Infektion
PIPES	Piperazin-N,N'bis[2-ethansulfatsäure]
PS	Pferdeserum
PTI-NB rat	<i>persistent, tolerant infection-newborn rat</i>
qPCR	quantitative <i>real time</i> RT-PCR
RBV	Reptiles Bornavirus
RIG-I	<i>retinoic acid inducible gene 1</i>
RNA	<i>ribonucleic acid</i> , Ribonukleinsäure
RNP	Ribonukleoprotein
rpm	rounds per minute, Umdrehungen pro Minute
r_s	Rangkorrelationskoeffizient nach Spearman
RT	Reverse Transkription
s	<i>sense</i>
SIV	Simian Immundefizienz-Virus

SLAM	<i>Signaling lymphocytic activation molecule</i>
SS	Schweineserum
SSC	<i>standard saline citrate</i> , Standard-Natriumacetat
ssDNA	einzelsträngige DNA
-ssRNA	negativ orientierte genomische virale RNA
+ssRNA	positiv orientierte virale RNA (Antigenom und mRNA)
Tab.	Tabelle
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TBS	<i>tris buffered saline</i> , trisgepufferte Kochsalzlösung
TEA	Triethanolamin
TNF	Tumornekrosefaktor
TrkA	Tyrosinkinase-Rezeptor-A
TrkB	Tyrosinkinase Rezeptor-B
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
U	Unit
vRNA	virale RNA
VSV	Vesikuläres Stomatitis Virus
X-Phosphat	s. BCIP
ZNS	Zentrales Nervensystem
ZS	Ziegenserum

Danksagung

Mein herzlichster Dank gilt

insbesondere Frau Prof. Dr. habil. Christiane Herden für die hervorragende Betreuung, das unermüdliche Engagement (auch tatkräftig im BSL3-Labor) und nicht zuletzt für die ansteckende Begeisterung für Forschung.

Herrn Prof. Dr. Manfred Reinacher für die freundliche Aufnahme in das Institut für Veterinär-Pathologie.

Herrn Dr. Markus Eickmann für die große Hilfe bei den virologischen Arbeiten und das entgegengebrachte Vertrauen für meine Arbeit im BSL3-Labor. Und auch für die regelmäßige Erinnerung daran, dass ich ja "bald" meine Doktorarbeit einreichen wollte.

Herrn Dr. Werner Hecht, der immer ein offenes Ohr und viel Geduld hatte, wenn ich "mal kurz" eine molekularbiologische Frage hatte.

Herrn Dr. Klaus Failing für die Unterstützung bei der statistischen Auswertung meiner Arbeit.

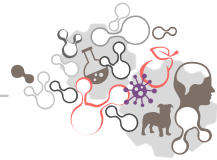
der Stiftung der Eheleute Dr. med. vet. Hans-Joachim und Gertrud Engemann für die finanzielle Unterstützung in Form eines 18-monatigen Stipendiums.

allen Mitarbeitern des Instituts für Veterinär-Pathologie für die Unterstützung auf so vielen Wegen.

Kristine, Silke und Laura für die super Einarbeitung und die unglaublich schöne Zeit in der Patho.

Nadine für die riesige Hilfe bei der Arbeit mit den Ratten und für die gute Gesellschaft bei den unzähligen Fahrten nach Marburg.

meiner Familie und Benni für ihre bedingungslose Unterstützung, unerschöpfliche Geduld und Zuversicht.



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

VVB LAUFERSWEILER VERLAG
STAUFBENGRING 15
D-35396 GIESSEN

Tel: 0641-5599888 Fax: -5599890
redaktion@doktorverlag.de
www.doktorverlag.de

ISBN: 978-3-8359-6444-0



9 17 8 3 8 3 5 19 6 4 4 4 0 11